

ФЕДЕРАЛЬНАЯ СЛУЖБА
ПО ИНТЕЛЛЕКТУАЛЬНОЙ СОБСТВЕННОСТИ

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ПАТЕНТУ

(21)(22) Заявка: 2008151507/10, 12.06.2007

(24) Дата начала отсчета срока действия патента:
12.06.2007

Приоритет(ы):

(30) Конвенционный приоритет:

12.06.2006 US 60/812,592

14.12.2006 EP PCT/EP2006/069734

(43) Дата публикации заявки: 20.07.2010 Бюл. № 20

(45) Опубликовано: 27.02.2013 Бюл. № 6

(56) Список документов, цитированных в отчете о
поиске: WO 2004084940 A, 07.10.2004. KERKMANN
MIREN ET AL. Spontaneous formation of nucleic
acid-based nanoparticles is responsible for high
interferon-alpha induction by CpG-A in
plasmacytoid dendritic cells. JOURNAL OF
BIOLOGICAL CHEMISTRY, v.280, №9, March
2005 (2005-03), p. 8086-8093. WO 03024480 A2,
27.03.2003.(85) Дата начала рассмотрения заявки PCT на
национальной фазе: 12.01.2009(86) Заявка PCT:
EP 2007/005188 (12.06.2007)(87) Публикация заявки PCT:
WO 2007/144150 (21.12.2007)

Адрес для переписки:

105082, Москва, Спартаковский пер., 2, стр. 1,
секция 1, эт.3, "ЕВРОМАРКПАТ", пат.пов.
И.А.Веселицкой

(72) Автор(ы):

КИНЦЛЕР Маттиас (CH),

ПРОБА Карл (CH)

(73) Патентообладатель(и):

ЦИТОС БИОТЕХНОЛОГИ АГ (CH)

(54) СПОСОБЫ УПАКОВКИ ОЛИГОНУКЛЕОТИДОВ В ВИРУСОПОДОБНЫЕ ЧАСТИЦЫ РНК-СОДЕРЖАЩИХ БАКТЕРИОФАГОВ

(57) Реферат:

Изобретение относится к области биотехнологии. Описан способ получения композиции, включающей (i) вирусоподобные частицы, причем указанные вирусоподобные частицы являются вирусоподобными частицами РНК-содержащего бактериофага, и (ii) олигонуклеотид, причем указанный

олигонуклеотид упакован в указанные вирусоподобные частицы. Также описан способ получения нуклеотидной композиции, включающей олигонуклеотиды, применимые в указанном выше способе. Также описана нуклеотидная композиция, получаемая способом настоящего изобретения, и ее применение. Указанная композиция предпочтительно

обладает чистотой по меньшей мере 98%, наиболее предпочтительно по меньшей мере 99%. Изобретение может быть

использовано в медицине. 3 н. и 22 з.п. ф-лы, 6 ил., 1 табл., 14 пр.

RU 2 4 7 6 5 9 5 C 2

RU 2 4 7 6 5 9 5 C 2



FEDERAL SERVICE
FOR INTELLECTUAL PROPERTY

(51) Int. Cl.

C12N 7/04 (2006.01)**A61K 39/00** (2006.01)(12) **ABSTRACT OF INVENTION**(21)(22) Application: **2008151507/10, 12.06.2007**(24) Effective date for property rights:
12.06.2007

Priority:

(30) Convention priority:

12.06.2006 US 60/812,592**14.12.2006 EP PCT/EP2006/069734**(43) Application published: **20.07.2010 Bull. 20**(45) Date of publication: **27.02.2013 Bull. 6**(85) Commencement of national phase: **12.01.2009**

(86) PCT application:

EP 2007/005188 (12.06.2007)

(87) PCT publication:

WO 2007/144150 (21.12.2007)

Mail address:

**105082, Moskva, Spartakovskij per., 2, str. 1,
seksija 1, eht.3, "EVROMARKPAT", pat.pov.
I.A.Veselitskoj**

(72) Inventor(s):

KINTsLER Mattias (CH),**PROBA Karl (CH)**

(73) Proprietor(s):

TsITOS BIOTEKhnOLOGI AG (CH)(54) **METHODS OF PACKAGING OF OLIGONUCLEOTIDES INTO VIRUS-LIKE PARTICLES OF RNA-CONTAINING BACTERIOPHAGES**

(57) Abstract:

FIELD: biotechnology.

SUBSTANCE: method of preparation of composition comprising (i) virus-like particles is described, and the said virus-like particles are virus-like particles of RNA-containing bacteriophage, and (ii) an oligonucleotide, and the said oligonucleotide is packaged in the said virus-like particles. Also a method of production of nucleotide

composition comprising oligonucleotides used in the above mentioned methods is described. Also the nucleotide composition produced with the method of this invention and their application is described. The said composition preferably has a purity of at least 98%, most preferably at least 99%. The invention can be used in medicine.

EFFECT: increased purification.

25 cl, 6 dwg, 1 tbl, 14 ex

Текст описания приведен в факсимильном виде.

Область техники, к которой относится изобретение

Настоящее изобретение относится к способам получения композиций, включающих (i) вирусоподобную частицу, которая является вирусоподобной частицей РНК-содержащего бактериофага, и (ii) олигонуклеотид, причем указанный олигонуклеотид упакован в указанную вирусоподобную частицу.

Настоящее изобретение также предусматривает способы получения нуклеотидных композиций, включающих олигонуклеотиды, пригодные для применения в указанных выше способах. Настоящее изобретение также предусматривает нуклеотидные композиции, которые можно получить способами настоящего изобретения и их применения. Настоящее изобретение также предусматривает композиции, включающие (i) вирусоподобную частицу, которая является вирусоподобной частицей РНК-содержащего бактериофага, и (ii) олигонуклеотид, причем указанный олигонуклеотид упакован в указанную вирусоподобную частицу, причем указанные композиции могут быть получены

способами настоящего изобретения и предпочтительно обладают чистотой по меньшей мере, соответствующей 98 %, наиболее предпочтительно по меньшей мере 99 %.

Уровень техники

Вирусоподобные частицы РНК-содержащих бактериофагов, упакованные олигонуклеотидами, являются мощными стимуляторами иммунной системы (WO2003/024481A2) и широко применяются в современной терапии вакцинами. Способы получения композиций, включающие (i) вирусоподобную частицу, причем указанная вирусоподобная частица является вирусоподобной частицей РНК-содержащего бактериофага, и (ii) олигонуклеотид, причем указанный олигонуклеотид упакован в указанную вирусоподобную частицу, описаны, например, в WO2003/024481A2, WO2004/000351A1, WO2004/084940A1 и WO2004/007538A2. Наиболее широко используются способы, основанные на разборке рекомбинантных вирусоподобных частиц, очистке белка оболочки и повторной сборке рекомбинантных вирусных частиц в присутствии нуклеиновой кислоты. Эффективные и масштабируемые способы для получения рекомбинантных вирусоподобных частиц РНК-содержащих бактериофагов описаны в WO2005/117963A1. Способы крупномасштабной очистки несодержащих эндотоксина вирусоподобных частиц описаны в WO2007/039552A1. Способы получения белков оболочки из рекомбинантно полученных вирусоподобных частиц («разборка») описаны наряду с другими в WO2003/024481A2, а также в примерах настоящей заявки. Способы сборки белков оболочки в присутствии нуклеиновой кислоты («повторной сборки»), описанные в предшествующем уровне техники, не оптимизированы в плане эффективности, стабильности и чистоты собранного продукта. В частности, в предшествующем уровне техники не указано, что эффективность процесса «повторной сборки» может быть резко улучшена за счет применения агрегированных олигонуклеотидов с определенным размером частиц (которые описывают в настоящем изобретении по относительному времени начала выхода пика, см. ниже). Такое применение предусматривает «повторную сборку» с резко улучшенной эффективностью, приводящей к упаковке продукта очень высокой чистоты. Обычно и предпочтительно в результате способа «повторной сборки», описанного в настоящем изобретении, выход белка и выход олигонуклеотида составляет по меньшей мере примерно 75 %, и в результате

получают продукт (композицию, включающую вирусоподобную частицу, упакованную олигонуклеотидом), который обычно и предпочтительно обладает по меньшей мере 99% чистотой.

Краткое описание изобретения

Настоящее изобретение относится к способу получения композиции, включающей (i) вирусоподобную частицу, которая является вирусоподобной частицей РНК-содержащего бактериофага, и (ii) олигонуклеотид, причем указанный олигонуклеотид упакован в указанную вирусоподобную частицу. В ходе указанного способа вирусо-подобные частицы формируются самосборкой белков оболочки указанного РНК-содержащего бактериофага в присутствии олигонуклеотида. Неожиданно было установлено, что эффективность процесса может быть существенно улучшена, если самосборка белков оболочки осуществляется в присутствии агрегированного олигонуклеотида. Обычно олигонуклеотиды, включающие по меньшей мере один отрезок поли G, способны агрегировать. Стадия агрегирования олигонуклеотида может быть описана по относительному времени начала выхода пика в эксклюзионной ВЭЖХ, используя в качестве стандарта капсид указанного РНК-содержащего бактериофага. Олигонуклеотид, характеризуемый относительным временем начала выхода пика 50-110 %, предпочтительно 80-95 %, был признан оптимальным. Это соответствует олигонуклеотидным агрегатам, соответствующим определенной молекулярной массе, которые находятся в диапазоне определенной молекулярной массы капсида указанного РНК-содержащего бактериофага или несколько ниже. Установлено, что олигонуклеотид, характеризуемый желаемым относительным временем начала выхода пика, может быть получен путем процесса агрегирования указанного олигонуклеотида.

Таким образом, первым объектом настоящего изобретения является способ получения нуклеотидной композиции, включающей олигонуклеотид, в которой предпочтительно указанный олигонуклеотид характеризуется относительным временем начала выхода пика 50-110 %, указанный процесс включает стадии: (a) обеспечения олигонуклеотида в растворе II, причем указанный олигонуклеотид содержит по меньшей мере один отрезок поли-G, и указанный раствор II имеет рН 5-8, причем указанный раствор II содержит катион, и предпочтительно концентрация указанного катиона в указанном растворе II составляет по

5 меньшей мере 20 мМ, причем указанный катион предпочтительно выбран из группы, включающей Na^+ , K^+ , NH_4^+ , Li^+ , Ca^{2+} и Mg^{2+} , (б) регулирования температуры раствора II до температуры III, причем указанная температура III составляет 50-99 °С, и (в) инкубирования указанного олигонуклеотида в

10 растворе II при температуре III, причем указанное инкубирование проводят до тех пор, пока указанный олигонуклеотид характеризуется относительным временем начала выхода пика 50-110 %, и (г) регулирования температуры раствора II до температуры IV, причем указанная температура IV ниже 50 °С, причем указанные стадии предпочтительно проводят в указанном порядке.

15 Самосборка указанного белка оболочки наиболее эффективна, если препарат нуклеотида включает агрегаты, включающие оптимального размера частицы при узком диапазоне распределения по размерам. Затем неожиданно было обнаружено, что стадия агрегирования олигонуклеотида может

20 контролироваться более эффективно, и что могут быть получены препараты олигонуклеотида с более узким диапазоном распределения по размерам, если олигонуклеотид подвергается стадии дезагрегации перед стадией агрегирования.

25 Указанный способ может включать какое-либо из свойств и вариантов осуществления настоящего изобретения, описанных в настоящем изобретении в какой-либо комбинации.

30 Таким образом, второй объект настоящего изобретения представляет способ получения нуклеотидной композиции, включающей олигонуклеотид, в которой предпочтительно указанный олигонуклеотид характеризуется относительным

35 временем начала выхода пика 50-110 %, и указанный способ включает стадии: (а) обеспечения олигонуклеотида в растворе I, причем указанный олигонуклеотид содержит по меньшей мере один отрезок поли-G, и указанный

40 раствор I имеет щелочной pH, (б) дезагрегации указанного олигонуклеотида, причем указанная дезагрегация включает стадии: (i) регуляции температуры раствора I до температуры I, причем указанная температура I составляет 4-70°С,

45 (ii) инкубирования указанного олигонуклеотида в указанном растворе I при указанной температуре I, причем указанное инкубирование проводят до тех пор, пока указанный олигонуклеотид характеризуется относительным временем

50 начала выхода пика примерно 110 %, и (iii) регулирования температуры указанного раствора I до температуры II, причем указанная температура II составляет 0-70°С, (в) регулирования pH указанного раствора I до величины 5-8,

и (г) агрегирования указанного олигонуклеотида, включающего стадии: (i) обеспечения указанного олигонуклеотида в растворе II, причем указанный раствор II имеет pH 5-8 и катион, причем предпочтительно концентрация указанного катиона в указанном растворе II составляет по меньшей мере 20 мМ, и предпочтительно указанный катион выбран из группы, включающей Na^+ , K^+ , NH_4^+ , Li^+ , Ca^{2+} и Mg^{2+} , (ii) регулирования температуры раствора II до температуры III, причем указанная температура III составляет 50-99°C, (iii) инкубирования указанного олигонуклеотида в растворе II при температуре III, причем указанное инкубирование проводят до тех пор, пока указанный олигонуклеотид характеризуется относительным временем начала выхода пика 50-110 %, и (iv) регулирования температуры раствора II до температуры IV, причем указанная температура IV ниже 50 °C, причем указанные стадии предпочтительно проводят в указанном порядке. Указанный способ может включать какое-либо из свойств и вариантов осуществления настоящего изобретения, описанных в настоящем изобретении в какой-либо комбинации.

Третьим объектом настоящего изобретения является нуклеотидная композиция, включающая олигонуклеотид, причем указанная нуклеотидная композиция может быть получена одним из способов, описанных выше, причем предпочтительно указанный олигонуклеотид характеризуется относительным временем начала выхода пика 50-110 %. Указанная нуклеотидная композиция может включать какое-либо из свойств и вариантов осуществления настоящего изобретения, описанных в настоящем изобретении в какой-либо комбинации.

Четвертым объектом настоящего изобретения является способ получения композиции, включающей (i) вирусоподобную частицу, причем указанная вирусоподобная частица является вирусоподобной частицей РНК-содержащего бактериофага, и (ii) олигонуклеотид, причем указанный олигонуклеотид упакован в указанную вирусоподобную частицу, причем указанный способ включает стадии: (а) обеспечения белка оболочки указанного РНК-содержащего бактериофага, (б) обеспечения нуклеотидной композиции, включающей олигонуклеотид, причем указанная нуклеотидная композиция является нуклеотидной композицией, получаемой одним из способов по первому и второму объекту настоящего изобретения, (в) формирования смеси, причем указанная смесь включает: (i) указанный белок оболочки, (ii) агент, способный препятствовать самосборке указанного белка оболочки, (iii) указанный

олигонуклеотид, (г) удаления указанного агента из указанной смеси, и (д) допущения самосборки указанного белка оболочки в вирусоподобную частицу. Указанная нуклеотидная композиция может включать какое-либо из свойств и вариантов осуществления настоящего изобретения, описанных в настоящем изобретении в какой-либо комбинации.

Пятым объектом настоящего изобретения является способ получения композиции, включающей: (i) вирусоподобную частицу, причем вирусоподобная частица является вирусоподобной частицей РНК-содержащего бактериофага, и (ii) олигонуклеотид, причем указанный олигонуклеотид упакован в указанную вирусоподобную частицу, указанный способ включает стадии: (а) обеспечения белка оболочки указанного РНК-содержащего бактериофага, (б) обеспечения олигонуклеотида, (i) причем указанный олигонуклеотид содержит по меньшей мере один отрезок поли-Г, и (ii) указанный олигонуклеотид характеризуется относительным временем начала выхода пика 50-110 %, (в) формирования смеси, причем указанная смесь включает: (i) указанный белок оболочки, (ii) агент, способный препятствовать самосборке указанного белка оболочки, (iii) указанный олигонуклеотид, (г) удаления указанного агента из указанной смеси, и (д) допущения самосборки указанного белка оболочки в вирусоподобную частицу. Указанный способ может включать какое-либо из свойств и вариантов осуществления настоящего изобретения, описанных в настоящем изобретении в какой-либо комбинации.

Шестым объектом настоящего изобретения является способ получения композиции, включающей (i) вирусоподобную частицу, которая является вирусоподобной частицей РНК-содержащего бактериофага, и (ii) олигонуклеотид, который упакован в вирусоподобную частицу, причем указанный способ включает стадии: (а) обеспечения белковой оболочки указанного РНК-содержащего бактериофага, (б) обеспечения олигонуклеотида, причем предпочтительно указанный олигонуклеотид характеризуется относительным временем начала выхода пика 50-110 %, указанное обеспечение включает стадии: (i) обеспечения олигонуклеотида в растворе II, причем указанный раствор II имеет рН 5-8 и катион, причем предпочтительно концентрация указанного катиона в указанном растворе II составляет по меньшей мере 20 мМ, и в котором предпочтительно указанный катион выбран из группы, состоящей из Na^+ , K^+ , NH_4^+ , Li^+ , Ca^{2+} и Mg^{2+} , (ii) регуляции

температуры раствора II до температуры раствора III, причем указанная температура III составляет 50-99°C, и (iii) инкубирования указанного олигонуклеотида в растворе II при температуре III, причем указанное инкубирование осуществляют до тех пор, пока указанный олигонуклеотид характеризуется относительным временем начала выхода пика 50-110 %, и (iv) регуляции температуры раствора II до температуры IV, причем указанная температура IV ниже 50°C, причем стадии (i)-(iv) предпочтительно проводятся в указанном порядке, (v) получения смеси, которая включает: (i) указанный белок оболочки, (ii) агент, способный предупреждать самосборку указанного белка оболочки, (iii) указанный олигонуклеотид, (г) удаления указанного агента из указанной смеси, и (д) осуществления самосборки указанного белка оболочки в вирусоподобную частицу. Указанный способ может включать какое-либо из свойств и вариантов осуществления настоящего изобретения, описанных в настоящем изобретении в какой-либо комбинации.

Седьмым объектом настоящего изобретения является способ получения композиции, включающей (i) вирусоподобную частицу, которая является вирусоподобной частицей РНК-содержащего бактериофага, и (ii) олигонуклеотид, который упакован в вирусоподобную частицу, причем указанный способ включает стадии: (а) обеспечения белковой оболочки указанного РНК-содержащего бактериофага, (б) обеспечения олигонуклеотида, причем предпочтительно указанный олигонуклеотид характеризуется относительным временем начала выхода пика 50-110 %, указанное обеспечение включает стадии: (i) обеспечения олигонуклеотида в растворе I, причем указанный нуклеотид содержит по меньшей мере один отрезок поли-G, и указанный раствор I имеет щелочной pH, (ii) дезагрегации указанного олигонуклеотида, причем указанная дезагрегация включает стадии: (1) регуляции температуры раствора I до температуры I, причем указанная температура I составляет 4-70°C, (2) инкубации указанного олигонуклеотида в указанном растворе I при указанной температуре I, причем указанную инкубацию проводят до тех пор, пока указанный олигонуклеотид характеризуется относительным временем выхода пика примерно 110 %, и (3) регуляции температуры указанного раствора I до температуры II, причем указанная температура II составляет 0-70°C, (iii) регуляции pH указанного раствора I до величины pH 5-8, и (iv) агрегация указанного олигонуклеотида,

причем указанная агрегацию включает стадии: (1) обеспечения указанного олигонуклеотида в растворе II, причем указанный раствор II имеет pH 5-8 и катион, причем предпочтительно концентрация указанного катиона в указанном
 5 растворе II составляет по меньшей мере 20 мМ, и предпочтительно указанный катион выбран из группы, включающей Na^+ , K^+ , NH_4^+ , Li^+ , Ca^{2+} и Mg^{2+} , (2) регуляции температуры раствора II до температуры III, причем указанная
 10 температура III составляет 50-99°C, (3) инкубации указанного олигонуклеотида в растворе II при температуре III, причем указанная инкубация проводится до тех пор, пока указанный олигонуклеотид характеризуется относительным
 15 временем начала выхода пика 50-110 %, и (4) регуляции температуры раствора II до температуры IV, причем указанная температура IV ниже 50°C, причем стадии (i)-(iv) предпочтительно проводят в указанном порядке, (v) получения смеси, причем указанная смесь включает: (i) указанный белок оболочки, (ii) агент,
 20 способный предупредить самосборку указанного белка оболочки, (iii) указанный олигонуклеотид, (г) удаления указанного агента из указанной смеси, и (д) допущения самосборки указанного белка оболочки в вирусоподобную частицу.
 25 Указанный способ может включать какое-либо из свойств и вариантов осуществления настоящего изобретения, описанных в настоящем изобретении в какой-либо комбинации.

30 Восьмым объектом настоящего изобретения является применение нуклеотидной композиции, получаемой одним из способов настоящего изобретения, в способе получения композиции, включающей (i) вирусоподобную частицу, причем указанная вирусоподобная частица является вирусоподобной
 35 частицей РНК-содержащего бактериофага, и (ii) олигонуклеотид, причем указанный олигонуклеотид упакован в указанную вирусоподобную частицу.

40 Девятым объектом настоящего изобретения является композиция, получаемая по одному из способов настоящего изобретения, причем указанная композиция включает (i) вирусоподобную частицу, причем указанная вирусоподобная частица является вирусоподобной частицей РНК-содержащего
 45 бактериофага, и (ii) олигонуклеотид, причем указанный олигонуклеотид упакован в указанную вирусоподобную частицу, причем предпочтительно указанный РНК-содержащий бактериофаг является бактериофагом Q β , а также предпочтительно указанным олигонуклеотидом является олигонуклеотид G8-8 (SEQ ID NO:6) или G10 (SEQ ID NO:8), предпочтительно G10 (SEQ ID NO:8),
 50

кроме того, предпочтительно чистота указанной композиции составляет по меньшей мере 98 %, более предпочтительно по меньшей мере 99 %, и наиболее предпочтительно по меньшей мере 99,2 %.

Краткое описание фигур

Фиг. 1. Хроматограмма эксклюзивной ВЭЖХ стандартного капсида Q β (вверху) и агрегированного G10 (внизу). ВЭЖХ проводят согласно описанию в примере 4. Время удержания стандарта составляет 8,532 мин, время начала выхода пика агрегированного G10 составляет 7,510 мин. Таким образом, относительное время начала выхода пика агрегированного G10 составляет 88 % (7,510 мин/8,532 мин•100).

Фиг. 2. Хроматограмма эксклюзивной ВЭЖХ необработанного олигонуклеотида G10, агрегированного G10 и стандарта капсида Q β . ВЭЖХ проводят согласно описанию в примере 4 (А). Агрегированный G10, который не подвергался дезагрегации перед агрегацией, имеет равную или повышенную молекулярную массу по сравнению с капсидом Q β (А, рамка 2). Относительное время начала выхода пика составляет примерно 75 %. (Б) Агрегированный G10, который подвергался дезагрегации перед агрегацией согласно описанию в примере 1, имеет меньшую молекулярную массу по сравнению с капсидом Q β (Б, рамка 2). Относительное время начала выхода пика составляет примерно 88 %.

Фиг. 3: CD спектры необработанного, дезагрегированного и агрегированного олигонуклеотида G10 и заново агрегированных ВПЧ, упакованных олигонуклеотидом G10. Спектры записывали, используя концентрации олигонуклеотида 22,5 мкМ и последовательно нормализованные. Для нормализации коэффициенты эллиптичности рассчитывают по формуле: $\Theta = 100 \times \text{CD сигнал [миллиградус]/л [см]} \times c [\text{мМ}]$.

Фиг. 4. Описание очищенного белка оболочки Q β с помощью аналитической эксклюзионной хроматографии. (А) Образец очищенных ВПЧ бактериофага Q β . Наблюдаемый пик (соотношение A260/A280 = 2) определяется РНК-содержимым ВПЧ, поскольку коэффициент абсорбции РНК при 260 нм примерно в 100 раз выше, чем коэффициент абсорбции белка оболочки. (Б) Образец надосадочной жидкости реакции дезагрегации. Высвободившийся белок оболочки выявляют по наличию пика, напоминающего пик белка, примерно на

12 мин. Кроме того, несколько типов молекул неосаждаемой РНК находятся в диапазоне 6,8-11 мин. (В) Образец очищенного белка оболочки бактериофага Q β . Анализ проводят в ФСБ на колонке TSK G5000PWxl (фирма Tosoh Bioscience).

Фиг. 5. Аналитическая эксклюзионная хроматография (А) нативных ВПЧ Q β , (Г) Q β G10 ВПЧ и упаковываемых компонентов (Б) олигонуклеотида G10 и (В) белка оболочки бактериофага Q β . Наблюдаемый пик Q β G10 ВПЧ (Г) (соотношение A260/A280 = 1,74) определяют по содержащемуся в сердцевине олигонуклеотиду G10 в ВПЧ, поскольку коэффициент абсорбции G10 при 260 нм составляет примерно в 130 раз большую величину по сравнению с коэффициентом абсорбции белка оболочки. Анализ проводили в ФСБ на колонке TSK G5000PWxl (фирма Tosoh Bioscience).

Фиг. 6. Нередуцирующий анализ SDS-PAGE нативных ВПЧ Q β и собранных *in vitro* Q β G10. Показано положение пентамер и гексамер белка оболочки ((а) маркер молекулярной массы, (б) Q β ВПЧ, (в) Q β G10).

Подробное описание изобретения

Определения и варианты осуществления, описанные ниже, если не указано иначе, применимы к одному из объектов и вариантов осуществления настоящего изобретения, в частности, способы, композиции, нуклеотидные композиции и применения настоящего изобретения. Если не указано иначе, все технические и научные термины, используемые в настоящем изобретении, имеют то же значение, которое обычно подразумевается специалистами в данной области, к которой относится настоящее изобретение.

В контексте настоящего изобретения понятие «олигонуклеотид» относится к однонитевому дезоксирибонуклеотиду. Предпочтительный олигонуклеотид включает по меньшей мере один отрезок поли-G, согласно описанному ниже. Более предпочтительно олигонуклеотиды включают 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 или 10 указанных отрезков поли-G. Весьма предпочтительны олигонуклеотиды, которые включают именно два отрезка поли-G, в которых предпочтительно один из указанных двух отрезков поли-G расположен с 5'-конца или с 3'-конца указанного олигонуклеотида. Еще более предпочтительными являются олигонуклеотиды, которые включают именно два отрезка поли-G, в которых один из указанных двух отрезков поли-G расположен с 5'-конца указанного

олигонуклеотида, а другой из двух указанных отрезков поли-G расположен с 3'-конца указанного олигонуклеотида. Обычно и предпочтительно олигонуклеотид в контексте настоящего изобретения состоит из 6-1000, предпочтительно 10-1000, более предпочтительно 10-200, еще более предпочтительно 10-100, еще более предпочтительно 20-40, и наиболее предпочтительно 30 нуклеотидов. Кроме того, предпочтительные олигонуклеотиды состоят из 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 или 40 нуклеотидов. Еще более предпочтительны олигонуклеотиды, которые состоят из 24-32 нуклеотидов, более предпочтительно примерно из 30 нуклеотидов.

Понятие «олигонуклеотид» также относится к молекулам, включающим по меньшей мере один модифицированный нуклеотид, причем предпочтительно указанный модифицированный нуклеотид выбран из (а) аналога нуклеотида (б) нуклеотида, включающего модификацию каркаса молекулы. В одном из вариантов осуществления настоящего изобретения олигонуклеотид включает по меньшей мере один модифицированный нуклеотид, выбранный из группы, включающей: (а) нуклеиновую кислоту, кодирующую пептид, (б) инозин, (в) тритилированные основания, (г) фосфототиоаты, (д) алкилфосфототиоаты; (е) 5-нитроиндол-дезоксирибофуранозил, (ж) 5-метилдезоксцитозин и (з) 5,6-дигидро-5,6-дигидроксидезокситимидин. В еще одном варианте осуществления настоящего изобретения олигонуклеотид включает или, в другом варианте, состоит из фосфототиоатных нуклеотидов. Фосфототиоатные нуклеотиды защищены от разрушения в клетке или организме, и, следовательно, они являются примером предпочтительных нуклеотидных модификаций. Предпочтительными также являются химически, ферментативно или метаболически модифицированные формы полинуклеотидов, которые обычно обнаруживаются в природе. Однако предпочтительные олигонуклеотиды состоят исключительно из немодифицированных нуклеотидов, т.е. аденозина, тимидина, гуанозина и/или цитидина. Кроме того, также предпочтительные олигонуклеотиды состоят из нуклеотидов, соединенных фосфодиэфирной связью.

Весьма предпочтительными являются олигонуклеотиды, включающие неметилированные мотивы CpG, содержащие по меньшей мере один, предпочтительно два, три или четыре мотива CpG. Еще более предпочтительны олигонуклеотиды, которые включают палиндромную последовательность, причем предпочтительно указанная палиндромная последовательность включает

по меньшей мере один, предпочтительно один, два, три или четыре мотива CpG. Еще более предпочтительные олигонуклеотиды включают палиндромную последовательность, причем предпочтительно указанная палиндромная последовательность включает последовательность GACGATCGTC (SEQ ID NO:1), или, предпочтительно, состоит из нее. Еще более предпочтительные олигонуклеотиды включают палиндромную последовательность, причем указанная палиндромная последовательность фланкируется с 5'-конца отрезком поли-G и с 3'-конца фланкируется отрезком поли-G, причем предпочтительно указанная палиндромная последовательность является последовательность GACGATCGTC (SEQ ID NO:1). Весьма предпочтительные олигонуклеотиды включают палиндромную последовательность, причем указанная палиндромная последовательность фланкирована с 5'-конца по меньшей мере 3-10, предпочтительно 4-10 единицами гуанозина и с 3'-конца по меньшей мере 3-10, предпочтительно 4-10 единицами гуанозина, причем предпочтительно указанная палиндромная последовательность является последовательность GACGATCGTC (SEQ ID NO:1).

Понятие «поли-G отрезок» относится к сегменту олигонуклеотида, причем указанный сегмент состоит по меньшей мере из 3 последовательно расположенных остатков гуанозина. Предпочтительные отрезки поли-G состоят из 3-25, предпочтительно 4-20, более предпочтительно 4-15 и наиболее предпочтительно 4-10 последовательно расположенных остатков гуанозина. Также предпочтительно отрезки поли-G состоят из 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19 или 20 последовательно расположенных остатков гуанозина.

В контексте настоящего изобретения понятие «мотив CpG» относится к короткой последовательности ДНК, предпочтительно последовательности одонитевой ДНК, включающей динуклеотид цитозин (C)-гуанозин (G), причем C является неметилированным и предпочтительно указанный динуклеотид содержит фосфодиэфирную связь. Предпочтительно мотив CpG включает по меньшей мере один, предпочтительно один, два или три дополнительных нуклеотида с 5'- и/или 3'-конца указанного динуклеотида CG, кроме того, предпочтительно указанные дополнительные нуклеотиды не содержат динуклеотид CG.

Понятие «относительное время начала выхода пика» означает параметр, который показывает состояние агрегирования олигонуклеотида. Относительное время начала выхода пика олигонуклеотида определяют с помощью аналитической эксклюзионной ВЭЖХ, причем предпочтительно указанный метод ВЭЖХ выполняют, в основном или полностью придерживаясь следующих параметров:

Колонка: TSKgel 5000 PWWL 7,8 мм * 30,0 см (Партия: 5PWX06GNMH3304, номер в каталоге: 08023, фирма Tosoh Bioscience)

Элюент: ФСБ (150 мМ NaCl в 20 мМ буфере фосфата натрия, pH 7,2)

Впрыскиваемый объем: 40,0 мкл (предпочтительно в концентрации примерно от 20 мкМ до примерно 500 мкМ)

Скорость потока: 0,8 мл/мин

Градиент: Изократическая хроматография

Время пробега: 20 мин

Длина волны: 215, 260 и 280 нм, оценка данных при 260 нм

Поддержание температуры колонки: 25°C

Температура автоматической пипетки: 8°C,

причем в указанном методе капсид указанного РНК-содержащего бактериофага используют в качестве стандарта. Относительное время начала выхода пика X % указанного олигонуклеотида относительно капсида указанного РНК-содержащего бактериофага подсчитывают следующим образом: $X \% = \frac{\text{время начала выхода пика [мин] олигонуклеотида}}{\text{время удержания стандарта [мин]}} \times 100 \%$, причем время начала выхода пика олигонуклеотида определяют в качестве времени, при котором элюция олигонуклеотида становится выявляемой, и время удержания стандарта определяют в качестве времени выхода максимального пика указанного стандарта. Таким образом, в варианте осуществления настоящего изобретения, в котором указанным РНК-содержащим бактериофагом является, например, бактериофаг AP205, капсид AP205 используют в качестве стандарта в указанном методе ВЭЖХ и относительное время начала выхода пика указанного нуклеотида подсчитывают относительно указанного стандарта AP205. Важно, что в вариантах осуществления настоящего изобретения, которые не относятся к РНК-содержащему бактериофагу, относительное время начала выхода пика всегда определяют, используя капсид бактериофага Q β в качестве стандарта.

Кроме того, в случае какого-либо сомнительного выбора соответствующего стандарта в указанном методе ВЭЖХ, капсид бактериофага Q β используют в качестве стандарта и относительное время начала выхода пика определяют относительно указанного капсида бактериофага Q β . Таким образом, в весьма предпочтительном варианте осуществления настоящего изобретения указанное относительное время начала выхода пика определяют с помощью указанного метода ВЭЖХ, в котором предпочтительно указанным стандартом является капсид бактериофага Q β , и в котором также предпочтительно указанное относительное время начала выхода пика определяют относительно указанного капсида бактериофага Q β .

В контексте настоящего изобретения понятие «упакованный» относится к состоянию олигонуклеотида в связи с вирусоподобной частицей. Применение понятий «олигонуклеотид, упакованный в ВПЧ» или «ВПЧ, упакованная олигонуклеотидом» является равноценным. В контексте настоящего изобретения понятие «упакованный» относится к нековалентному связыванию, предпочтительно к ионным взаимодействиям, гидрофобным взаимодействиям или водородным связям. Весьма предпочтительно в контексте настоящего изобретения понятие «упакованный» относится к включению или частичному включению указанного олигонуклеотида в ВПЧ. Например, олигонуклеотид, предпочтительно олигонуклеотид, характеризуемый относительным временем начала выхода пика 50-110 %, может быть заключен внутри ВПЧ без формирования какого-либо реального связывания – ковалентного или нековалентного. Обычно и предпочтительно ВПЧ, упакованные олигонуклеотидом, защищают указанный олигонуклеотид от разрушения, предпочтительно от гидролиза ДНКазой. Следовательно, в предпочтительном смысле, понятие «упакованный» означает, что олигонуклеотид в упакованном состоянии не подвергается гидролизу ДНКазой. Более предпочтительно понятие «упакованный» означает, что олигонуклеотид недоступен гидролизу ДНКазой, причем также предпочтительно ДНКазой является ДНКазой I или бензоназой. Еще более предпочтительно понятие «упакованный» показывает, что олигонуклеотид недоступен гидролизу бензоназой.

Доступность олигонуклеотида для действия ДНКазы (например, ДНКазы I или бензоназы) предпочтительно методом, описанным в примерах 11-17 патента WO2003/024481A2 (см. с. 111 в указанном патенте). В предпочтительном смысле

ВПЧ рассматривают в виде упакованной олигонуклеотидом частицы, если после обработки бензоназой (190 Ед бензоназы/мг белка оболочки в буфере, включающем 2 мМ $MgCl_2$, pH 7,2, 20-25°C, 18 ч) по меньшей мере 90 %, предпочтительно по меньшей мере 95 %, наиболее предпочтительно по меньшей мере 98 % указанного олигонуклеотида может быть выделено из указанных ВПЧ (например, из геля, окрашенного этидиумбромидом). Специалисту в данной области очевидно, что такие исследования нуждаются в соответствующих контролях, и может потребоваться их адаптация к специфической комбинации ВПЧ и олигонуклеотида. В более предпочтительном смысле олигонуклеотид рассматривается в качестве упакованного в ВПЧ РНК-содержащего бактериофага, если после обработки бензоназой (190 Ед бензоназы/мг белка оболочки в буфере, содержащем 2 мМ $MgCl_2$, pH 7,2, при 20-25°C, в течение 18 ч) по меньшей мере 90 %, предпочтительно по меньшей мере 95 %, наиболее предпочтительно по меньшей мере 98 % указанного олигонуклеотида может быть выделено из указанных ВПЧ РНК-содержащего бактериофага. В весьма предпочтительном смысле олигонуклеотид G10 (SEQ ID NO:8) рассматривается в качестве упакованного в ВПЧ РНК-содержащего бактериофага олигонуклеотид, если после обработки бензоназой (190 Ед бензоназы/мг белка оболочки в буфере, содержащем 2 мМ $MgCl_2$, pH 7,2, при 20-25°C, в течение 18 ч) по меньшей мере 90 %, предпочтительно по меньшей мере 95 %, наиболее предпочтительно по меньшей мере 98 % указанного олигонуклеотида G10 может быть выделено из указанных ВПЧ. В более определенном смысле, олигонуклеотид G10 (SEQ ID NO:8) рассматривается в качестве упакованного в ВПЧ РНК-содержащего бактериофага Q β , AP205, GA или fr олигонуклеотида, если после обработки бензоназой (190 Ед бензоназы/мг белка оболочки в буфере, включающем 2 мМ $MgCl_2$, pH 7,2, при 20-25°C, в течение 18 ч) по меньшей мере 90 %, предпочтительно по меньшей мере 95 %, наиболее предпочтительно по меньшей мере 98 % указанного олигонуклеотида G10 может быть выделено из указанных ВПЧ РНК-содержащего бактериофага. В весьма определенном смысле, олигонуклеотид G10 (SEQ ID NO:8) рассматривается в качестве упакованного в ВПЧ РНК-содержащего бактериофага Q β олигонуклеотида, если после обработки бензоназой (190 Ед бензоназы/мг белка оболочки в буфере, включающем 2 мМ $MgCl_2$, pH 7,2, при 20-25°C, в течение 18 ч) по меньшей мере 90 %, предпочтительно по меньшей

мере 95 %, наиболее предпочтительно по меньшей мере 98 % указанного неметилованного CpG-содержащего олигонуклеотида может быть выделено из указанных ВПЧ РНК-содержащего бактериофага Q β .

Понятие «белок оболочки» в контексте настоящего изобретения означает белок (белки) РНК-содержащего бактериофага, которые могут быть включены в капсидную сборку бактериофага или РНК-содержащего бактериофага. Таким образом, понятие «белок оболочки» относится к белку, формирующему капсид РНК-содержащего бактериофага или вирусоподобную частицу (ВПЧ) РНК-содержащего бактериофага. Обычно и предпочтительно белок оболочки РНК-содержащего бактериофага имеет димерную структуру.

В контексте настоящего изобретения понятие «фрагмент (рекомбинантного) белка оболочки», в частности, фрагмент рекомбинантного белка оболочки, означает полипептид, который составляет по меньшей мере 70%, предпочтительно по меньшей мере 80%, более предпочтительно по меньшей мере 90%, еще более предпочтительно по меньшей мере 95% длины белка оболочки дикого типа, или рекомбинантного белка дикого типа, соответственно, и предпочтительно сохраняет способность формировать ВПЧ. Предпочтительно фрагмент получают по меньшей мере в результате одной внутренней делеции по меньшей мере одного усечения или по меньшей мере одной их комбинацией.

Понятие «фрагмент рекомбинантного белка оболочки» или «фрагмент белка оболочки» может также включать полипептид, который обладает по меньшей мере 80 %, предпочтительно 90 %, еще более предпочтительно 95 % аминокислотной идентичности последовательностей относительно белка оболочки дикого типа, соответственно, и который предпочтительно способен к самосборке в вирусоподобную частицу. Понятие «мутантный белок оболочки» относится к полипептиду, имеющему аминокислотную последовательность, производную от рекомбинантного белка дикого типа, или белка оболочки, соответственно, причем аминокислотная последовательность по меньшей мере на 80%, предпочтительно по меньшей мере на 85%, 90%, 95%, 97% или 99% идентична последовательности дикого типа и предпочтительно сохраняет способность к сборке в ВПЧ.

В контексте настоящего изобретения понятие «вирусоподобная частица (ВПЧ)» означает нереплицирующуюся или неинфекционную, предпочтительно нереплицирующуюся и неинфекционную структуру, вирусную структуру, или

означает нереплицирующуюся или неинфекционную, предпочтительно нереплицирующуюся и неинфекционную структуру, напоминающую вирусную частицу, предпочтительно капсид вируса. Понятие «нерепликативный» в контексте настоящего изобретения относится к неспособности реплицировать геном, заключенный в ВПЧ. Понятие «неинфекционный» в контексте настоящего изобретения относится к неспособности внедряться в клетку-хозяина. Предпочтительно вирусоподобная частица в связи с настоящим изобретением является нерепликативной и/или неинфекционной, поскольку она утратила весь или часть вирусного генома или геномной функции. В одном варианте осуществления настоящего изобретения вирусоподобной частицей является вирусная частица, в которой вирусный геном был физически или химически инактивирован, удален разборкой и последующей сборкой, или сборкой очищенных белков в ВПЧ. Обычно и более предпочтительно вирусоподобные частицы утратили все или часть репликативных и инфекционных компонентов вирусного генома. Вирусоподобная частица в соответствии с настоящим изобретением может содержать нуклеиновую кислоту, отличающуюся от геномной нуклеиновой кислоты данного вируса. Типичной и предпочтительной вирусоподобной частицей в соответствии с настоящим изобретением является вирусный капсид, например, вирусный капсид соответствующего вируса, бактериофага, предпочтительно РНК-содержащего бактериофага. Понятие «капсид» относится к макромолекулярной сборке, включающей субъединицы вирусного белка. Обычно содержится 60, 120, 180, 240, 300, 360 и более 360 субъединиц вирусного белка. Обычно и предпочтительно взаимодействия этих субъединиц приводят к формированию вирусного капсида, которому свойственна определенная регулярная организация, причем указанная структура обычно и предпочтительно является сферической. Например, капсиды РНК-содержащих бактериофагов обладают сферической формой с симметрией икосаэдра.

В контексте настоящего изобретения понятие «вирусоподобная частица РНК-содержащего бактериофага» означает вирусоподобную частицу, включающую или предпочтительно в значительной степени состоящую из белков оболочки, из их мутантных форм или фрагментов, РНК-содержащего бактериофага. Кроме того, вирусоподобная частица РНК-содержащего бактериофага, напоминающая структуру РНК-содержащего бактериофага,

является нерепликативной и/или неинфекционной, утратившей по меньшей мере ген или гены, кодирующие механизм репликации РНК-содержащего бактериофага, и обычно также утратившая ген или гены, кодирующие белок или белки, ответственные за присоединение или внедрение вируса в клетку-хозяина. Предпочтительные ВПЧ РНК-содержащего бактериофага обладают симметрией икосаэдра и содержат 180 субъединиц. В контексте настоящего изобретения понятие «вирусоподобная частица РНК-содержащего бактериофага» предпочтительно относится к макромолекулярной структуре, получаемой самосборкой рекомбинантного белка оболочки РНК-содержащего бактериофага, его фрагментов или мутантов, причем предпочтительно указанная самосборка происходит в присутствии олигонуклеотида.

Понятие «агент, способный предупреждать самосборку белка оболочки» относится к агенту, который предупреждает спонтанное формирование вирусоподобных частиц в указанной смеси. Специалист может определить химическую природу и соответствующую концентрацию указанного агента экспериментально, например, анализом указанной смеси с помощью эксклюзионной хроматографии по методу, описанному в примере 9. Агент способен предупреждать самосборку белка оболочки, если после инкубирования указанной смеси по меньшей мере в течение 1 ч при комнатной температуре, предпочтительно при 22°C не обнаруживают вирусоподобных частиц с помощью эксклюзионной хроматографии по методу, описанному в примере 9. Однако агент, способный предупреждать самосборку белка оболочки, не модифицирует указанный белок необратимо, и удаление указанного агента из указанной смеси может привести к спонтанному формированию вирусоподобных частиц. К предпочтительным агентам, способным предупреждать самосборку белка оболочки, относятся детергенты, гуанидиний гидрохлорид и мочевины, наиболее предпочтительным агентом является мочевина. Предпочтительными детергентами являются натрий додецилсульфат, Твин 20, Тритон X 100 и др. Обычно и предпочтительно к агентам, способным предупреждать самосборку белка оболочки, также относится восстанавливающий агент, который сохраняет внутримолекулярные дисульфидные связи, формируемые остатками цистеина указанного белка оболочки на стадии восстановления.

Понятие «выход белка» в способе настоящего изобретения означает количество белка оболочки, выделенного в виде вирусоподобных частиц на

последней стадии способа, относительно количества белка оболочки, содержащегося в указанной смеси, причем предпочтительно количество указанного белка оболочки определяют методом исследования белка Bradford. Обычно и предпочтительно по меньшей мере 70 %, предпочтительно по меньшей мере 75 % белка оболочки, содержащегося в указанной смеси, выделяют в виде вирусоподобных частиц на последней стадии указанного способа, причем предпочтительно указанная конечная стадия является указанной стерильной фильтрацией.

Понятие «выход олигонуклеотида» в способе настоящего изобретения означает количество олигонуклеотида, которое может быть выделено в способе настоящего изобретения из указанных вирусоподобных частиц после последней стадии способа, относительно указанного количества олигонуклеотида, содержащегося в указанной смеси, причем предпочтительно количество указанного олигонуклеотида, выделенного из указанных вирусоподобных частиц, определяют в существенной степени или предпочтительно методом, описанным в примере 9. Обычно и предпочтительно по меньшей мере 70 %, предпочтительно по меньшей мере 75 % олигонуклеотида, содержащегося в указанной смеси, выделяют из вирусоподобных частиц на последней стадии указанного способа, причем предпочтительно указанная конечная стадия является указанной стерильной фильтрацией.

Чистоту композиции в способе настоящего изобретения, включающей (i) вирусоподобную частицу, причем указанная вирусоподобная частица является вирусоподобной частицей РНК-содержащего бактериофага, и (ii) олигонуклеотид, причем указанный олигонуклеотид упакован в указанную вирусоподобную частицу, определяют с помощью аналитической эксклюзионной ВЭЖХ, причем указанный метод ВЭЖХ проводят в условиях, которые в значительной степени, предпочтительно полностью, совпадают с описанным в примере 4. Чистоту указанной композиции определяют в виде процента площади пика указанной вирусоподобной частицы, содержащейся в указанной композиции, относительно общей площади пика той же хроматограммы. Обычно и предпочтительно чистота композиции настоящего изобретения составляет по меньшей мере 98 %, предпочтительно по меньшей мере 99 %.

Понятие «один» используют в настоящем описании в значении «по меньшей мере, один» или «один или более», если не указано иначе.

Понятие «примерно» в настоящем описании означает разброс +/- 10 %.
Например, «примерно 100» означает величину от 90 до 110.

Настоящее изобретение предусматривает способы получения нуклеотидной композиции, включающей агрегированный олигонуклеотид. Точнее, настоящее изобретение предусматривает способ получения нуклеотидной композиции, включающей олигонуклеотид, причем предпочтительно указанный олигонуклеотид характеризуется относительным временем начала выхода пика 50-110 %, указанный способ включает стадии: (а) обеспечения олигонуклеотида в растворе II, причем указанный олигонуклеотид предпочтительно включает с 5'-конца по меньшей мере 3 единицы гуанозина, и с 3'-конца по меньшей мере 3 единицы гуанозина, указанный раствор II имеет величину pH 5-8, и указанный раствор II включает катион, причем предпочтительно концентрация указанного катиона в указанном растворе II составляет по меньшей мере 20 мМ, причем указанный катион предпочтительно выбран из группы, состоящей из Na^+ , K^+ , NH_4^+ , Li^+ , Ca^{2+} и Mg^{2+} , (б) регулирования температуры раствора II до температуры III, причем указанная температура III равна 50-99 °C, и (в) инкубирования указанного олигонуклеотида в растворе II при температуре III, причем указанное инкубирование проводят до тех пор, пока указанный олигонуклеотид характеризуется относительным временем начала выхода пика 50-110 %, и (г) регулирования температуры раствора II до температуры IV, причем указанная температура IV ниже 50°C, причем указанные стадии предпочтительно выполняют в заданном порядке. Все варианты осуществления, описанные ниже, применимы в данном способе в какой-либо комбинации.

Согласно указанному выше, было установлено, что преимуществом является дезагрегация указанного олигонуклеотида перед стадией агрегации, причем предпочтительно, чтобы указанный олигонуклеотид был полностью дезагрегирован. Полная дезагрегация олигонуклеотида означает, что the apparent молекулярная масса олигонуклеотида методом эксклюзионной ВЭЖХ, предпочтительно выполненным согласно описанию в примере 4, соответствует молекулярной массе, которая может быть производной последовательности указанного олигонуклеотида. Таким образом, настоящее изобретение также предусматривает способ получения нуклеотидной композиции, включающей

олигонуклеотид, причем предпочтительно указанный олигонуклеотид характеризуется относительным временем начала выхода пика 50-110 %, указанный способ включает стадии: (а) обеспечения олигонуклеотида в растворе I, причем указанный олигонуклеотид содержит по меньшей мере один отрезок поли-G, и б) указанного раствора I имеет щелочной pH, (б) дезагрегации указанного олигонуклеотида, причем указанная дезагрегация включает стадии: (i) регуляции температуры раствора I до температуры I, причем указанная температура I равна 4-70°C, (ii) инкубирования указанного олигонуклеотида в указанном растворе I при указанной температуре I, причем указанное инкубирование проводят до тех пор, пока указанный олигонуклеотид характеризуется относительным временем выхода пика примерно 110 %, и (iii) регуляции температуры указанного раствора I до температуры II, причем указанная температура II равна 0-70°C, (в) регуляции pH указанного раствора I до величины pH 5-8, и (г) агрегации указанного олигонуклеотида, причем указанная агрегация включает стадии: (i) обеспечения указанного олигонуклеотида в растворе II, причем указанный раствор II имеет pH 5-8 и содержит катион, причем предпочтительно концентрация указанного катиона в указанном растворе II составляет по меньшей мере 20 мМ, и предпочтительно указанный катион выбран из группы, содержащей Na^+ , K^+ , NH_4^+ , Li^+ , Ca^{2+} и Mg^{2+} , (ii) регуляции температуры раствора II до температуры III, причем указанная температура III равна 50-99°C, (iii) инкубирования указанного олигонуклеотида в растворе II при температуре III, причем указанное инкубирование проводят до тех пор, пока указанный олигонуклеотид характеризуется относительным временем начала выхода пика 50-110 %, и (iv) регуляции температуры раствора II до температуры IV, причем указанная температура IV ниже 50 °C, причем указанные стадии предпочтительно проводят в заданном порядке.

Дезагрегация необработанного олигонуклеотида, который может содержать частично агрегированный олигонуклеотид, происходит при щелочном pH.

Процесс дезагрегации может быть облегчен за счет повышения температуры.

Таким образом, в одном из вариантов осуществления настоящего изобретения раствор I имеет pH 8-13, предпочтительно 10-13, наиболее предпочтительно 12. Раствор I может включать какой-либо буфер, или агент, известный в данной области, который позволяет регулировать pH в диапазоне 8-

13. В предпочтительном варианте осуществления настоящего изобретения раствор I включает гидроксид, предпочтительно гидроксид металла, наиболее предпочтительно гидроксид щелочного или щелочноземельного металла, предпочтительно гидроксид щелочного металла. В предпочтительном варианте осуществления настоящего изобретения указанным гидроксидом является гидроксид калия или гидроксид натрия, наиболее предпочтительно гидроксид натрия. В одном из вариантов осуществления настоящего изобретения концентрация указанного гидроксида, предпочтительно указанного гидроксида натрия, в указанном растворе I равна 10-200 мМ, более предпочтительно примерно 25 мМ, наиболее предпочтительно 25 мМ.

Чтобы избежать разрушения олигонуклеотида, температура I предпочтительно не превышает 90°C, температура I не превышает 70°C. В одном из вариантов осуществления настоящего изобретения, температура I является комнатной температурой, предпочтительно 19-25°C. В другом варианте осуществления настоящего изобретения температура I равна 4-70°C, предпочтительно 20-70°C, более предпочтительно 45-70°C, предпочтительно примерно 50°C, и наиболее предпочтительно 50°C. В предпочтительном варианте осуществления настоящего изобретения указанное инкубирование указанного олигонуклеотида в указанном растворе I при указанной температуре I проводится до тех пор, пока указанный олигонуклеотид полностью дезагрегирует. В другом варианте осуществления настоящего изобретения указанное инкубирование указанного олигонуклеотида в указанном растворе I при указанной температуре I проводят до тех пор, пока относительное время начала выхода пика указанного олигонуклеотида превышает примерно 110 %, предпочтительно примерно 130 % и наиболее предпочтительно примерно 135 %. В другом предпочтительном варианте осуществления настоящего изобретения указанное инкубирование указанного олигонуклеотида в указанном растворе I при указанной температуре I проводят в течение 30-190 мин, предпочтительно в течение 50-90 мин, наиболее предпочтительно в течение 70 мин.

В еще одном предпочтительном варианте осуществления настоящего изобретения концентрация указанного олигонуклеотида в указанном растворе I составляет от 50 мкМ до 2 мМ, предпочтительно 50-500 мкМ, более предпочтительно 200-300 мкМ, и наиболее предпочтительно 260 мкМ.

Дезагрегация олигонуклеотида может быть прекращена нейтрализацией или подкислением раствора I и/или понижением температуры. Таким образом, указанный способ также включает стадию регуляции pH указанного раствора I до pH 8 или ниже, предпочтительно до pH 5-8. В предпочтительном варианте осуществления настоящего изобретения указанную регуляцию pH проводят до тех пор, пока указанный pH равен 6-7, наиболее предпочтительно до тех пор, пока указанный pH равен примерно 6. В другом варианте осуществления настоящего изобретения указанную регуляцию pH указанного раствора I проводят добавлением кислоты к указанному раствору I. Для этой цели может быть применена какая-либо минеральная или органическая кислота, известная в данной области. В предпочтительном варианте осуществления настоящего изобретения указанную кислоту выбирают из группы, состоящей из фосфорной кислоты, соляной кислоты и органических кислот, причем указанные органические кислоты предпочтительно выбраны из муравьиной кислоты, уксусной кислоты и лимонной кислоты. В предпочтительном варианте осуществления настоящего изобретения указанной кислотой является минеральная кислота. Предпочтительно, указанная кислота является фосфорной кислотой или соляной кислотой, наиболее предпочтительно фосфорной кислотой.

Указанный способ также включает регуляцию температуры указанного раствора I до температуры II, причем предпочтительно указанная температура II равна 0-70°C и предпочтительно указанная температура II ниже температуры I. В предпочтительном варианте осуществления настоящего изобретения указанная температура II равна 0-25°C, предпочтительно 0-10°C, и наиболее предпочтительно 0-2°C.

Способ также включает стадию агрегации указанного олигонуклеотида. Агрегация олигонуклеотида достигается инкубированием указанного олигонуклеотида примерно при нейтральном pH в растворе, включающем катионы, способные поддерживать формирование структур G-квадруплексной ДНК (см. Simonsson T., Biol. Chem. 382, сс. 621-628), при температуре примерно 50°C. Таким образом, в одном из вариантов осуществления указанного изобретения указанный катион выбирают из группы, состоящей из Na^+ , K^+ , Rb^+ , NH_4^+ , Cs^+ , Li^+ , Sr^{2+} , Ba^{2+} , Ca^{2+} , Mn^{2+} , Co^{2+} , Ni^{2+} и Mg^{2+} . В предпочтительном варианте осуществления настоящего изобретения указанный катион выбирают

из группы, включающей Na^+ , K^+ , NH_4^+ , Li^+ , Ca^{2+} и Mg^{2+} , более предпочтительно указанный катион является Na^+ или K^+ , наиболее предпочтительно указанный катион является Na^+ . В высокой степени предпочтительном варианте осуществления настоящего изобретения концентрация

В предпочтительном варианте осуществления настоящего изобретения раствор II, включающий указанный олигонуклеотид, получают добавлением указанного катиона к указанному раствору I, причем предпочтительно указанное добавление осуществляют после указанной регуляции pH раствора I.

В еще одном варианте осуществления настоящего изобретения смесь каких-либо катионов в указанном растворе II выбрана из группы, содержащей Na^+ , K^+ , Rb^+ , NH_4^+ , Cs^+ , Li^+ , Sr^{2+} , Ba^{2+} , Ca^{2+} , Mn^{2+} , Co^{2+} , Ni^{2+} и Mg^{2+} . В еще одном варианте осуществления настоящего изобретения смесь каких-либо катионов в указанном растворе II выбрана из группы, содержащей Na^+ , K^+ , NH_4^+ , Li^+ , Ca^{2+} и Mg^{2+} . В весьма предпочтительном варианте осуществления настоящего изобретения указанная смесь включает Na^+ и K^+ , или предпочтительно состоит из них.

В предпочтительном варианте осуществления настоящего изобретения указанный раствор II включает по меньшей мере 20 мМ, предпочтительно по меньшей мере 100 мМ, более предпочтительно 200-275 мМ, и наиболее предпочтительно 250 мМ указанного катиона или указанной смеси катионов. В весьма предпочтительном варианте осуществления настоящего изобретения указанный раствор II включает 250 мМ Na^+ и K^+ , наиболее предпочтительно 250 мМ Na^+ . В еще одном предпочтительном варианте осуществления настоящего изобретения указанный раствор II включает 250 мМ натрия хлорида или калия хлорида, наиболее предпочтительно 250 мМ натрия хлорида. Однако какая-либо соль из числа натриевой, калиевой, аммонийной, литиевой, кальциевой или магниевой соли, может быть применена для этой цели.

В еще одном варианте осуществления настоящего изобретения указанный олигонуклеотид в указанном растворе II составляет от 50 мкМ до 2 мМ, предпочтительно 100-300 мкМ, наиболее предпочтительно 175 мкМ.

В еще одном варианте осуществления настоящего изобретения указанный способ также включает регуляцию температуры раствора II до температуры III, причем указанная температура III равна 50-99°C, предпочтительно 80-90°C, более предпочтительно примерно 85°C, и наиболее предпочтительно 85°C.

В еще одном варианте осуществления настоящего изобретения указанный способ включает инкубирование указанного олигонуклеотида в растворе II при температуре III, причем указанное инкубирование проводят до тех пор, пока указанный олигонуклеотид характеризуется относительным временем начала выхода пика 50-110 %, предпочтительно 80-95 %, более предпочтительно 80-90 %, еще более предпочтительно 83-90 %, еще более предпочтительно 85-90 %, и наиболее предпочтительно 88 %. В весьма предпочтительном варианте осуществления настоящего изобретения указанным олигонуклеотидом является G10 (SEQ ID NO:8) и указанное инкубирование проводят до тех пор, пока указанный олигонуклеотид характеризуется относительным временем начала выхода пика 50-110 %, предпочтительно 80-95 %, более предпочтительно 80-90 %, еще более предпочтительно 83-90 %, еще более предпочтительно 85-90 %, и наиболее предпочтительно 88 %.

Время инкубирования, требуемое для получения олигонуклеотида, характеризующегося желаемым относительным временем начала выхода пика, зависит от последовательности и чистоты олигонуклеотида и обычно варьирует предпочтительно примерно от 5 мин до примерно 30 мин. В предпочтительном варианте осуществления настоящего изобретения указанным олигонуклеотидом является G10 (SEQ ID NO:8), и указанное инкубирование указанного олигонуклеотида в указанном растворе II при указанной температуре III проводят в течение 9-24 мин.

Процесс агрегирования прекращают охлаждающим раствором II при температуре ниже 50°C. В предпочтительном варианте осуществления настоящего изобретения указанный процесс включает стадию регуляции температуры II до температуры IV, причем указанная температура IV ниже 50°C, и в котором предпочтительно указанная температура IV равна 0-25°C, более предпочтительно 0-10°C, и наиболее предпочтительно 0-2°C.

Установлено, что скорость нагревания и/или охлаждения в способе настоящего изобретения воздействует на выход и распределение частиц по размеру полученного агрегированного олигонуклеотида. В частности было установлено, что при увеличении объемов в настоящем способе выход и распределение частиц по размеру может быть дополнительно улучшено за счет скорости изменения температуры (т.е. темпа нагревания или охлаждения) по меньшей мере равной 3,6°C/мин. Специалист может выбрать определенную

скорость изменения температура путем стандартизации условий осуществления
 способа, касающихся выбранных объема реакции, конфигурации и
 теплопроводности реакционной емкости и разницы температур. В
 5 предпочтительном варианте осуществления настоящего изобретения указанная
 регуляция температуры раствора I до температуры I, указанная регуляция
 температуры указанного раствора I до температуры II, указанная регуляция
 10 температуры раствора II до температуры III, и/или указанная регуляция
 температуры раствора II до температуры IV выполняются с темпом изменения
 температуры по меньшей мере 3,6°C/мин. В предпочтительном варианте
 15 осуществления настоящего изобретения указанная регуляция температуры
 раствора II до температуры III осуществляется со скоростью изменения
 температуры по меньшей мере 3,6°C/мин, причем предпочтительно указанная
 скорость изменения температуры составляет примерно 7°C/мин. В
 20 предпочтительном варианте осуществления настоящего изобретения указанная
 регуляция температуры раствора II до температуры IV осуществляется с темпом
 изменения температуры по меньшей мере 3,6°C/мин, причем предпочтительно
 25 указанный темп изменения температуры составляет примерно 7°C/мин.

Для обеспечения способности формировать агрегаты указанный
 олигонуклеотид содержит по меньшей мере один, предпочтительно два отрезка
 30 поли-G. В предпочтительном варианте осуществления настоящего изобретения
 указанный олигонуклеотид содержит с 5'-конца по меньшей мере 3,
 предпочтительно по меньшей мере 4 единицы гуанозина, и с 3'-конца по
 35 меньшей мере 3, предпочтительно по меньшей мере 4 единицы гуанозина. В еще
 одном предпочтительном варианте осуществления настоящего изобретения
 указанный олигонуклеотид включает с 5'-конца по меньшей мере 4 единицы
 гуанозина, и с 3'-конца по меньшей мере 4 единицы гуанозина. В
 40 предпочтительном варианте осуществления настоящего изобретения указанный
 олигонуклеотид включает с 5'-конца по меньшей мере 3, и не более 20,
 предпочтительно не более 15 единиц гуанозина, и, с 3'-конца по меньшей мере 3,
 45 и не более 20, предпочтительно не более 15 единиц гуанозина. В
 предпочтительном варианте осуществления настоящего изобретения указанный
 олигонуклеотид включает с 5'-конца по меньшей мере 3, предпочтительно по
 50 меньшей мере 4, и не более 11 единицы гуанозина и с 3'-конца по меньшей мере
 3, предпочтительно по меньшей мере 4 и не более 10 единиц гуанозина. В еще

одном предпочтительном варианте осуществления настоящего изобретения указанный олигонуклеотид является неметилованным CpG-содержащим олигонуклеотидом, причем предпочтительно указанный неметилованный CpG-содержащий олигонуклеотид содержит два отрезка поли-G, причем предпочтительно каждый из указанных отрезков поли-G содержит по меньшей мере 4 единицы гуанозина, и, кроме того, предпочтительно указанный неметилованный CpG-содержащий олигонуклеотид включает палиндромную последовательность, причем указанная палиндромная последовательность локализована между указанными отрезками поли-G. В предпочтительном варианте осуществления настоящего изобретения указанный олигонуклеотид включает с 5'-конца по меньшей мере 3, предпочтительно по меньшей мере 4 единицы гуанозина, и с 3'-конца по меньшей мере 3, предпочтительно по меньшей мере 4 единицы гуанозина, причем указанный олигонуклеотид дополнительно включает палиндромную последовательность, причем предпочтительно указанной палиндромной последовательностью является последовательность GACGATCGTC (SEQ ID NO:1).

В еще одном предпочтительном варианте осуществления настоящего изобретения указанный олигонуклеотид включает палиндромную последовательность, причем предпочтительно указанной палиндромной последовательностью является последовательность GACGATCGTC (SEQ ID NO:1), причем указанная палиндромная последовательность фланкирована с 5'-конца по меньшей мере 3, предпочтительно по меньшей мере 4, и не более 15 единиц гуанозина и указанная палиндромная последовательность фланкирована с 3'-конца по меньшей мере 3, предпочтительно по меньшей мере 4, и не более 15 остатками гуанидина.

В другом предпочтительном варианте осуществления настоящего изобретения указанный олигонуклеотид содержит 10-1000 нуклеотидов, предпочтительно 10-200 нуклеотидов, более предпочтительно 10-100 нуклеотидов, еще более предпочтительно 20-40 нуклеотидов, наиболее предпочтительно 30 нуклеотидов.

В весьма предпочтительном варианте осуществления настоящего изобретения указанный олигонуклеотид включает или предпочтительно состоит из последовательности нуклеиновой кислоты, выбранной из группы, включающей: (а) «G4-4» GGGGGACGAT CGTCGGGG (SEQ ID NO:2), (б) «G5-

5» GGGGGGACGA TCGTCGGGGG (SEQ ID NO:3), (в) «G6-6» GGGGGGACG
 ATCGTCGGGG GG (SEQ ID NO:4), (г) «G7-7» GGGGGGGGAC GATCGTCGGG
 GGGG (SEQ ID NO:5), (д) «G8-8» GGGGGGGGGA CGATCGTCGG GGGGGG
 (SEQ ID NO:6), (е) «G9-9» GGGGGGGGGG ACGATCGTCG GGGGGGGG (SEQ
 ID NO:7), (ж) «G10» GGGGGGGGGG GACGATCGTC GGGGGGGGGG (SEQ ID
 NO:8), (з) «G11» GGGGGGGGGG GGACGATCGT CGGGGGGGGG GG (SEQ ID
 NO:9), причем предпочтительно указанный олигонуклеотид полностью состоит
 из нуклеотидов с фосфодиэфирными связями. В еще более предпочтительном
 варианте осуществления настоящего изобретения указанный олигонуклеотид
 включает или предпочтительно состоит из последовательности нуклеиновой
 кислоты «G10» GGGGGGGGGGACGATCGTCGGGGGGGGGG (SEQ ID NO:8),
 причем предпочтительно указанный олигонуклеотид полностью состоит из
 нуклеотидов с фосфодиэфирными связями.

Настоящее изобретение также относится к нуклеотидной композиции,
 включающей олигонуклеотид, причем указанную нуклеотидную композицию
 получают каким-либо из описанных способов, используемых в каком-либо из
 вариантов осуществления, описанных выше, отдельно или в какой-либо
 комбинации. В частности, настоящее изобретение относится к нуклеотидной
 композиции, включающей олигонуклеотид, причем указанную нуклеотидную
 композицию получают каким-либо из описанных выше способов, причем
 предпочтительно указанный олигонуклеотид характеризуется относительным
 временем начала выхода пика 50-110 %, предпочтительно 80-95 %, более
 предпочтительно 80-90 %, еще более предпочтительно 83-90 %, еще более
 предпочтительно 85-90 %, и наиболее предпочтительно 88 %. В
 предпочтительном варианте осуществления настоящего изобретения указанная
 нуклеотидная композиция включает олигонуклеотид, причем указанный
 олигонуклеотид включает или предпочтительно состоит из последовательности
 нуклеиновой кислоты, выбранной из группы, включающей: (а) «G4-4»
 GGGGGACGAT CGTCGGGG (SEQ ID NO:2), (б) «G5-5» GGGGGGACGA
 TCGTCGGGGG (SEQ ID NO:3), (в) «G6-6» GGGGGGACG ATCGTCGGGG GG
 (SEQ ID NO:4), (г) «G7-7» GGGGGGGGAC GATCGTCGGG GGGG (SEQ ID
 NO:5), (д) «G8-8» GGGGGGGGGA CGATCGTCGG GGGGGG (SEQ ID NO:6), (е)
 «G9-9» GGGGGGGGGG ACGATCGTCG GGGGGGGG (SEQ ID NO:7), (ж) «G10»
 GGGGGGGGGG GACGATCGTC GGGGGGGGGG (SEQ ID NO:8), (з) «G11»

GGGGGGGGGG GGACGATCGT CGGGGGGGGG GG (SEQ ID NO:9), причем предпочтительно указанный олигонуклеотид полностью состоит из нуклеотидов, связанных фосфодиэфирными связями. В еще более предпочтительном варианте осуществления настоящего изобретения указанная нуклеотидная композиция включает олигонуклеотид, причем указанный олигонуклеотид состоит или предпочтительно состоит из последовательности нуклеиновой кислоты «G10» GGGGGGGGGGGGACGATCGTCGGGGGGGGGG (SEQ ID NO:8), причем предпочтительно указанный олигонуклеотид полностью состоит из нуклеотидов, связанных фосфодиэфирными связями. В весьма предпочтительном варианте осуществления настоящего изобретения указанная нуклеотидная композиция включает олигонуклеотид, причем указанный олигонуклеотид состоит из последовательности нуклеиновой кислоты «G10» GGGGGGGGGGGGACGATCGTCGGGGGGGGGG (SEQ ID NO:8), причем указанный олигонуклеотид полностью состоит из нуклеотидов, связанных фосфодиэфирными связями, и, кроме того, указанный олигонуклеотид характеризуется относительным временем начала выхода пика 50-110 %, предпочтительно 80-95 %, более предпочтительно 80-90 %, еще более предпочтительно 83-90 %, еще более предпочтительно 85-90 %, и наиболее предпочтительно 88 %.

Согласно указанному выше, нуклеотидные композиции настоящего изобретения применимы в способе получения композиции, включающей (i) вирусоподобную частицу, причем указанная вирусоподобная частица является вирусоподобной частицы РНК-содержащего бактериофага, и (ii) олигонуклеотид, причем указанный олигонуклеотид упакован в вирусоподобную частицу, поскольку агрегированный олигонуклеотид, содержащийся в нуклеотидных композициях настоящего изобретения, облегчает самосборку белка оболочки РНК-содержащего бактериофага и, таким образом, формирование вирусоподобных частиц РНК-содержащих бактериофагов, причем указанный олигонуклеотид упакован в указанные вирусоподобные частицы. Настоящее изобретение, следовательно, также относится к способу получения композиции, включающей (i) вирусоподобную частицу, причем указанная вирусоподобная частица является вирусоподобной частицы РНК-содержащего бактериофага, и (ii) олигонуклеотид, причем указанный олигонуклеотид упакован в указанную вирусоподобную частицу, указанный

способ включает стадии: (а) обеспечения белка оболочки указанного РНК-содержащего бактериофага, (б) обеспечения нуклеотидной композиции, включающей олигонуклеотид, причем указанная нуклеотидная композиция является нуклеотидной композицией, получаемой по одному из способов настоящего изобретения, (в) получения смеси, причем указанная смесь включает: (i) указанный белок оболочки, (ii) агент, способный предупреждать самосборку указанного белка оболочки, (iii) указанный олигонуклеотид, (г) удаления указанного агента из указанной смеси, и (д) допущения самосборки указанного белка оболочки в вирусоподобную частицу. Указанный способ может включать какое-либо из свойств и вариантов осуществления настоящего изобретения, описанных в настоящем изобретении в какой-либо комбинации.

Олигонуклеотид, который характеризуется относительным временем начала выхода пика 50-110 %, наиболее полезен для цели настоящего изобретения, поскольку олигонуклеотид, характеризующийся более высоким или пониженным относительным временем начала выхода пика может привести к низкому выходу. Таким образом, настоящее изобретение также предусматривает способ получения композиции, включающей (i) вирусоподобную частицу, причем указанная вирусоподобная частица является вирусоподобной частицей РНК-содержащего бактериофага, и (ii) олигонуклеотид, причем указанный олигонуклеотид упакован в указанную вирусоподобную частицу, указанный способ, включающий стадии: (а) обеспечения белка оболочки указанного РНК-содержащего бактериофага, (б) обеспечения олигонуклеотида, (i) причем указанный олигонуклеотид предпочтительно включает по меньшей мере один отрезок поли-G, и (ii) указанный олигонуклеотид характеризуется относительным временем начала выхода пика 50-110 %, (в) получения смеси, включающей: (i) указанный белок оболочки, (ii) агент, способный предупреждать самосборку указанного белка оболочки, (iii) указанный олигонуклеотид, (г) удаления указанного агента из указанной смеси, и (д) допущения самосборки указанного белка оболочки в вирусоподобную частицу. Указанный способ может включать какое-либо из свойств и вариантов осуществления настоящего изобретения, описанных в настоящем изобретении в какой-либо комбинации.

Специалист в данной области может получить и очистить белок оболочки РНК-содержащего бактериофага путем очистки указанного белка оболочки из

РНК-содержащих бактериофагов с помощью стандартных методов. Однако в предпочтительных вариантах осуществления настоящего изобретения рекомбинантно полученный указанный белок оболочки, предпочтительно по экспрессии указанного белка оболочки в *E. coli*. Способы получения белка оболочки РНК-содержащего бактериофага описаны в примерах. В предпочтительном варианте осуществления настоящего изобретения указанный белок оболочки включает или, в другом варианте, в значительной степени состоит, из рекомбинантных белков или их фрагментов РНК-содержащего бактериофага, причем предпочтительно указанный РНК-содержащий бактериофаг выбран из группы, включающей: (а) бактериофаг Q β , (б) бактериофаг R17, (в) бактериофаг fr, (г) бактериофаг GA, (д) бактериофаг SP, (е) бактериофаг MS2, (ж) бактериофаг M11, (з) бактериофаг MX1, (и) бактериофаг NL95, (к) бактериофаг f2, (л) бактериофаг PP7 и бактериофаг AP205. В предпочтительном варианте осуществления настоящего изобретения указанный РНК-содержащий бактериофаг является бактериофагом Q β . Способы и методики экспрессии и очистки вирусоподобных частиц РНК-содержащих бактериофагов, в частности бактериофага Q β , описаны в WO2006/125821A2 и WO2007/039552A1, которые включены в настоящее изобретение в виде ссылки. Белок оболочки РНК-содержащего бактериофага может быть получен разборкой вирусоподобных частиц, например, согласно описанию в приведенных в настоящем изобретении примерах.

В другом предпочтительном варианте осуществления настоящего изобретения указанный РНК-содержащий бактериофаг является бактериофагом AP205. Способные к сборке мутантные формы ВПЧ бактериофага AP205, включающие белок оболочки бактериофага AP205 с замещением пролина по положению 5 на треонин, также могут применяться в практике настоящего изобретения. WO 2004/007538 описывает, в частности в примере 2, как получить ВПЧ, включающую белки оболочки AP205, а также ее экспрессию и очистку. WO 2004/007538 включен в настоящее изобретение в виде ссылки.

В еще одном предпочтительном варианте осуществления настоящего изобретения указанный РНК-содержащий бактериофаг является бактериофагом Fr. Белок оболочки fr в форме рекомбинантной ВПЧ может быть получен по

методу Pushko P и др. (Prot Engin 6, 1993, сс.883-891). В еще одном предпочтительном варианте осуществления настоящего изобретения указанный РНК-содержащий бактериофаг является бактериофагом GA. ВПЧ GA могут быть получены путем клонирования кДНК белка оболочки GA, выделенного обратной транскрипцией с фага GA в pQb185, согласно описанию в примере патента WO2004/007538. Дезагрегация Fr и GA ВПЧ может быть легко получена инкубированием ВПЧ в 7 М мочеvine, необязательно с добавлением уксусной кислоты в концентрации 0,1 М. Нуклеиновую кислоту дополнительно очищают от белка оболочки с помощью ионообменной хроматографии либо при рН, при котором существенное количество белка оболочки проходит, а нуклеиновая кислота задерживается, либо при рН, при котором белок оболочки также адсорбируется на колонке и последовательно элюируется градиентом соли.

В одном предпочтительном варианте осуществления настоящего изобретения указанный белок оболочки включает или предпочтительно состоит из аминокислотной последовательности, выбранной из группы, включающей: (а) SEQ ID NO:10 (Qβ CP), (б) смесь SEQ ID NO:10 и SEQ ID NO:11 (белок Qβ A1), (в) SEQ ID NO:12 (белок оболочки R17), (г) SEQ ID NO:13 (белок оболочки fr), (д) SEQ ID NO:14 (белок оболочки GA), (е) SEQ ID NO:15 (белок оболочки SP), (ж) смесь SEQ ID NO:15 и SEQ ID NO:16, (з) SEQ ID NO:17 (MS2 белок оболочки), (и) SEQ ID NO:18 (M11 белок оболочки), (к) SEQ ID NO:19 (MX1 белок оболочки), (л) SEQ ID NO:20 (NL95 белок оболочки), (м) SEQ ID NO:21 (f2 белок оболочки), (н) SEQ ID NO:22 (PP7 белок оболочки) и (о) SEQ ID NO:23 (AP205 белок оболочки). В еще одном предпочтительном варианте осуществления настоящего изобретения белок поддерживающей оболочки включает или предпочтительно состоит из аминокислотной последовательности, выбранной из группы, включающей: (а) SEQ ID NO:10, (б) смесь SEQ ID NO:11 и SEQ ID NO:11, (в) SEQ ID NO:13, (г) SEQ ID NO:14, (д) SEQ ID NO:23. В другом в высокой степени предпочтительном варианте осуществления настоящего изобретения указанный белок поддерживающей оболочки включает или предпочтительно состоит из аминокислотной последовательности, выбранной из группы, включающей: (а) SEQ ID NO:10 и (б) смесь SEQ ID NO:10 и SEQ ID NO:11.

Кроме того, мутантный белок оболочки бактериофага Qβ, в котором доступные остатки лизина замещены на остатки аргинина, может быть

использован в настоящем изобретении. Таким образом, в другом предпочтительном варианте осуществления настоящего изобретения указанный белок оболочки включает, в существенной степени состоит или, в другом
5 варианте, состоит из мутантного белка оболочки Q β , согласно описанию в WO02/056905 (в примере 18 этого патента).

Кроме того, установлено, что белок оболочки РНК-содержащего
10 бактериофага способен к самосборке при экспрессии в бактериальной клетке-хозяине (Kastelein R.A. и др., Gene, 23, 1983, сс. 245-254, Kozlovskaya T.M. и др., Dokl. Akad. Nauk SSSR, 287, 1986, сс. 452-455, Adhin M.R. и др., Virology 170, 1989, сс. 238-242, Priano C. и др., J. Mol. Biol. 249, 1995, сс. 283-297). В
15 частности, были описаны биологические и биохимические свойства бактериофага GA (Ni C.Z. и др., Protein Sci. 5, 1996, сс. 2485-2493, Tars K. и др., J. Mol. Biol. 271, 1997, сс. 759-773) и бактериофага fr (Pushko P. и др., Prot. Eng. 6, 1993, сс. 883-891, Liljas L и др. J Mol. Biol. 244, 1994, сс. 279-290). Была
20 определена кристаллическая структура нескольких РНК-содержащих бактериофагов (Golmohammadi R. и др., Structure 4, 1996, сс. 543-554).

Обычно и предпочтительно способы, описанные в настоящем изобретении, для получения композиции, включающей: (i) вирусоподобную частицу, причем
указанная вирусоподобная частица является вирусоподобной частицей РНК-
30 содержащего бактериофага, и (ii) олигонуклеотид, причем указанный олигонуклеотид упакован в указанную вирусоподобную частицу, выполняют при комнатной температуре. В предпочтительном варианте осуществления
35 настоящего изобретения указанные способы выполняют при 15-30°C, предпочтительно при 19-25°C, наиболее предпочтительно при 22°C. В предпочтительном варианте осуществления настоящего изобретения указанное
40 получение указанной смеси, указанное удаление указанного агента из указанной смеси и/или указанное допущение самосборки указанного белка оболочки в вирусоподобную частицу проводят при 15-30°C, предпочтительно при 19-25°C, наиболее предпочтительно при 22°C.

45 Указанный способ включает получение смеси, включающей: (i) указанный белок оболочки, (ii) агент, способный предупреждать самосборку указанного белка оболочки, (iii) указанный олигонуклеотид. В предпочтительном варианте
50 осуществления настоящего изобретения концентрация указанного белка оболочки в указанной смеси составляет 0,5-10 мг/мл, предпочтительно 1-4

мг/мл, и наиболее предпочтительно 2,5 мг/мл, причем предпочтительно указанную концентрацию определяют методом Bradford. В еще одном предпочтительном варианте осуществления настоящего изобретения концентрация указанного олигонуклеотида в указанной смеси составляет 12,5-250 мкМ, более предпочтительно 25-100 мкМ, и наиболее предпочтительно 62,5 мкМ.

Для получения оптимального выхода способа упаковки, молярное соотношение указанного олигонуклеотида и указанного белка оболочки в указанной смеси составляет 0,5-1,2, предпочтительно 0,6-0,8 наиболее предпочтительно 0,7. Применение меньшего количества олигонуклеотида относительно белка оболочки может привести к низкому выходу, хотя применение большого избытка олигонуклеотида повышает стоимость и может привести к получению продукта низкой степени чистоты. В весьма предпочтительном варианте осуществления настоящего изобретения концентрация указанного белка оболочки в указанной смеси составляет 2,5 мг/мл, и концентрация указанного олигонуклеотида в указанной смеси составляет 62,5 мкМ.

Белки оболочки вирусов, в частности РНК-содержащих бактериофагов, обычно проявляют выраженную тенденцию к самосборке в капсидную структуру, например, в вирусоподобную частицу. Хотя и не в каждом случае, эта тенденция во многих случаях усиливается в присутствии нуклеиновых кислот, например, РНК или ДНК. Для получения оптимального перемешивания указанного белка оболочки и указанного олигонуклеотида перед самосборкой указанного белка оболочки, в указанную смесь включают агент, способный предупреждать самосборку указанного белка оболочки. Обычно и предпочтительно указанный агент представляет денатурирующее соединение. Многочисленные денатурирующие соединения известны в биохимии, к ним относятся детергенты, мочевины или гуанидиний гидрохлорид. Предпочтительными детергентами являются додецилсульфат натрия, твин 20, тритон X 100 и др. В предпочтительном варианте осуществления настоящего изобретения указанное денатурирующее соединение является мочевиной или гуанидиний гидрохлоридом, причем предпочтительно концентрация указанного денатурирующего соединения, предпочтительно указанная мочевина, в указанной смеси составляет 0,25-7,2 М, предпочтительно 1 М. В весьма

предпочтительном варианте осуществления настоящего изобретения указанное денатурирующее соединение является мочевиной, и концентрация указанной мочевины в указанной смеси составляет 0,5-2 М, предпочтительно 0,7-1,5 М, более предпочтительно 0,8-1,2 М, и наиболее предпочтительно 1 М.

В еще одном предпочтительном варианте осуществления настоящего изобретения

рН указанной смеси является примерно нейтральным, предпочтительно указанный рН равен величине 6-8, более предпочтительно 6,8-7,5, и наиболее предпочтительно указанный рН равен 7,2. В весьма предпочтительном варианте осуществления настоящего изобретения указанная смесь включает фосфатный буфер, предпочтительно буфер с фосфатом натрия, причем предпочтительно конечная концентрация указанного фосфатного буфера в указанной смеси равна 2-100 мМ, более предпочтительно 10-50 мМ, и наиболее предпочтительно примерно 20 мМ.

В еще одном варианте осуществления настоящего изобретения указанная смесь включает соль, причем предпочтительно указанная соль является галогенидом, предпочтительно хлоридом щелочного металла, более предпочтительно указанная соль является хлоридом калия, или хлоридом натрия, или их комбинацией, причем наиболее предпочтительно указанная соль является хлоридом натрия. В предпочтительном варианте осуществления настоящего изобретения концентрация указанной соли или указанной комбинации солей, предпочтительно концентрация указанного хлорида натрия, в указанной смеси равна 0-1 М, предпочтительно 0-550 мМ, более предпочтительно 0-350 мМ, еще более предпочтительно 50-350 мМ, и наиболее предпочтительно 250 мМ.

Капсид и/или вирусоподобные частицы определенных РНК-содержащих бактериофагов, в частности бактериофага Q β , бактериофага AP205 и бактериофага fr, стабилизированы внутримолекулярными дисульфидными связями между белковыми субъединицами, формирующими указанный капсид или вирусоподобную частицу. Добавление восстанавливающего агента к указанной смеси помогает сохранить указанные дисульфидные мостики на стадии восстановления и, таким образом, поддержать предупреждение самосборки указанной белковой оболочки. В предпочтительном варианте осуществления настоящего изобретения указанный агент также дополнительно

включает восстанавливающий агент, причем указанный восстанавливающий агент предпочтительно выбран из ДТЭ (дитиоэритоло), β -меркаптоэтанола, ТХЭФ (три(2-хлорэтил)фосфата) и других восстанавливающих агентов, хорошо известных в данной области. В предпочтительном варианте осуществления настоящего изобретения указанный восстанавливающий агент является ДТЭ, причем предпочтительно концентрация указанного ДТЭ в указанной смеси равна 1-25 мМ, предпочтительно 2,5 мМ. В весьма предпочтительном варианте осуществления настоящего изобретения указанный РНК-содержащий бактериофаг является бактериофагом Q β , бактериофагом AP205 или бактериофагом fr, и указанный агент также является восстанавливающим агентом, причем предпочтительно указанный восстанавливающий агент является ДТЭ, а также предпочтительно концентрация указанного ДТЭ в указанной смеси составляет 1-25 мМ, предпочтительно 2,5 мМ. В еще одном предпочтительном варианте осуществления настоящего изобретения указанный белок оболочки содержит остатки цистеина, способные формировать внутримолекулярные дисульфидные связи в указанной вирусоподобной частице, и указанный агент также включает восстанавливающий агент, причем предпочтительно указанный восстанавливающий агент является ДТЭ, и предпочтительно концентрация указанного ДТЭ в указанной смеси равна 1-25 мМ, предпочтительно 2,5 мМ.

В предпочтительном варианте осуществления настоящего изобретения указанное получение указанной смеси включает добавление (i) указанного белка оболочки, (ii) указанного агента, способного предупредить самосборку указанного белка оболочки, и (iii) указанного олигонуклеотида к указанной смеси, причем предпочтительно указанное добавление осуществляют в указанном порядке, и также предпочтительно указанную смесь перемешивают перед указанным добавлением указанного олигонуклеотида.

В еще одном предпочтительном варианте осуществления настоящего изобретения указанный способ также включает стадию инкубирования указанной смеси перед указанным удалением указанного агента, причем предпочтительно указанное инкубирование осуществляют на протяжении примерно 50-70, предпочтительно примерно 60 мин. В еще одном предпочтительном варианте осуществления настоящего изобретения инкубирование указанной смеси проводят при 15-30°C, более предпочтительно при 19-25°C, и наиболее предпочтительно при 22°C. В

еще одном предпочтительном варианте осуществления настоящего изобретения указанное инкубирование указанной смеси включает перемешивание указанной смеси, причем предпочтительно указанное перемешивание проводят примерно со скоростью 50-200 об./мин, наиболее предпочтительно примерно при 100 об./мин. В весьма предпочтительном варианте осуществления настоящего изобретения указанное инкубирование указанной смеси проводят примерно в течение 60 мин, и указанное инкубирование указанной смеси включает перемешивание указанной смеси, причем предпочтительно указанное перемешивание проводят примерно со скоростью 100 об./мин.

В одном из вариантов осуществления настоящего изобретения указанное удаление указанного агента из указанной смеси проводят, осуществляя замену первого буфера на первый буфер, причем предпочтительно указанную замену первого буфера проводят диализом или непрерывным потоком фильтрации, предпочтительно непрерывным потоком фильтрации. Указанную первую замену буфера осуществляют через мембрану, отсекающую соединения с определенной молекулярной массой, что позволяет удерживать указанный белок оболочки и проводить самосборку ВПЧ. В предпочтительном варианте осуществления настоящего изобретения указанную первую замену осуществляют через мембрану, отсекающую соединения с молекулярной массой 1-50 кДа, предпочтительно 5-30 кДа, наиболее предпочтительно 30 кДа. В весьма предпочтительном варианте осуществления настоящего изобретения указанную первую замену буфера проводят непрерывным потоком фильтрации через мембрану, отсекающую соединения с молекулярной массой 1-50 кДа, предпочтительно 30 кДа, причем также предпочтительно объем указанного первого буфера составляет примерно 6-кратный объем указанной смеси. В одном из предпочтительных вариантов осуществления настоящего изобретения указанной мембраной является мембрана Biomax-5 (PES), отсекающая соединения с молекулярной массой 30 кДа. В другом весьма предпочтительном варианте осуществления настоящего изобретения указанную первую замену буфера проводят непрерывным потоком фильтрации через мембрану, отсекающую соединения с молекулярной массой 1-50 кДа, предпочтительно 30 кДа, причем проникающий поток регулируется примерно до величины $96 \text{ л}/(\text{м}^2 \cdot \text{ч})$.

В предпочтительном варианте осуществления настоящего изобретения первый буфер включает соль, причем предпочтительно солевая композиция
указанного первого буфера идентична солевой композиции указанной смеси. В
5 предпочтительном варианте осуществления настоящего изобретения указанная соль в указанном первом буфере является галогенидом, предпочтительно
хлоридом щелочного металла, более предпочтительно указанная соль является
10 хлоридом калия, или хлоридом натрия, или их комбинацией, и, наиболее предпочтительно, указанной солью является хлорид натрия. В предпочтительном
варианте осуществления настоящего изобретения концентрация указанной соли,
15 или указанной комбинации солей, предпочтительно концентрация указанного хлорида натрия, в указанном первом буфере составляет 0-1 М, предпочтительно
0-550 мМ, более предпочтительно 0-350 мМ, еще более предпочтительно 50-350
20 мМ, и наиболее предпочтительно 250 мМ. В еще одном предпочтительном
варианте осуществления настоящего изобретения величина рН указанного
первого буфера составляет 6-8, более предпочтительно 6,8-7,5, и наиболее
предпочтительно указанный рН составляет 7,2. В еще одном предпочтительном
25 варианте осуществления настоящего изобретения указанный первый буфер
является фосфатным буфером, предпочтительно содержащим фосфат натрия, в
котором предпочтительно конечная концентрация указанного фосфатного
30 буфера в указанном первом буфере составляет 2-100 мМ, более предпочтительно
10-50 мМ и наиболее предпочтительно примерно 20 мМ.

Для стабилизации указанных вирусоподобных частиц, сформированных в
35 реакции самосборки, указанные вирусоподобные частицы предпочтительно
контактируют с окислителем, способным формировать межмолекулярные
дисульфидные связи в указанных вирусоподобных частицах. Таким образом, в
предпочтительном варианте осуществления настоящего изобретения указанный
40 способ дополнительно включает стадию контакта указанных вирусоподобных
частиц с окислителем, в которой предпочтительно указанный окислитель выбран
из группы, включающей: (а) перекись водорода, причем предпочтительно
45 концентрация указанной перекиси водорода составляет 0,25-50 мМ,
предпочтительно 2 мМ, (б) кислород, (в) глутатион, (г) аскорбат, (д) Cu^{2+} и (е)
 Fe^{3+} . В весьма предпочтительном варианте осуществления настоящего
50 изобретения указанный РНК-содержащий бактериофаг является бактериофагом
Q β , бактериофагом AP205 или бактериофагом fr, и указанный способ содержит

стадию контакта указанных вирусоподобных частиц с окислителем, причем предпочтительно указанный окислитель выбран из группы, включающей: (а) перекись водорода, причем предпочтительно концентрация указанной перекиси
5 водорода составляет 0,25-50 мМ, предпочтительно 2 мМ, (б) кислород, (в) глутатион, (г) Cu^{2+} и (д) Fe^{3+} , и наиболее предпочтительно указанным окислителем является перекись водорода, причем предпочтительно
10 концентрация указанной перекиси водорода составляет 0,25-50 мМ, предпочтительно 2 мМ. В предпочтительном варианте осуществления настоящего изобретения указанный белок оболочки включает остатки цистеина, способные формировать межмолекулярные дисульфидные связи в указанных
15 вирусоподобных частицах, причем предпочтительно указанный белок оболочки является белком оболочки бактериофага Q β , бактериофага AP205 или бактериофага fr, и указанный способ дополнительно включает стадию контакта указанных вирусоподобных частиц с окислителем, в которой предпочтительно
20 указанный окислитель выбран из группы, включающей: (а) перекись водорода, причем предпочтительно концентрация указанной перекиси водорода составляет 0,25-50 мМ, предпочтительно 2 мМ, (б) кислород, (в) глутатион, (г) аскорбат, (д) Cu^{2+} и (е) Fe^{3+} , причем наиболее предпочтительно указанным окислителем
25 является перекись водорода, причем предпочтительно концентрация указанной перекиси водорода составляет 0,25-50 мМ, предпочтительно 2 мМ.

В еще одном предпочтительном варианте осуществления настоящего изобретения указанный способ дополнительно включает стадию очистки
35 указанных вирусоподобных частиц, в которой предпочтительно указанная очистка включает вторую замену буфера на второй буфер, причем предпочтительно указанный второй буфер является фармацевтически приемлемым буфером. В предпочтительном варианте осуществления настоящего
40 изобретения указанную вторую замену буфера проводят на второй буфер, причем предпочтительно указанную вторую замену буфера проводят диализом или непрерывным потоком фильтрации, предпочтительно непрерывным потоком
45 фильтрации. Указанную вторую замену буфера проводят через мембрану, отсекающую соединения с такой молекулярной, которая позволяет задерживать указанные вирусоподобные частицы, и которая предпочтительно позволяет
50 проникать сквозь мембрану указанному белку оболочки и/или указанному олигонуклеотиду. Таким образом, в предпочтительном варианте осуществления

настоящего изобретения указанную вторую замену буфера проводят через мембрану, отсекающую соединения с молекулярной массой 100-1000 кДа, предпочтительно 300 кДа, причем предпочтительно указанную вторую замену буфера проводят непрерывным потоком фильтрации. В весьма предпочтительном варианте осуществления настоящего изобретения указанной мембраной является мембрана PLСМК-300, отсекающая соединения с молекулярной массой 300 кДа. В весьма предпочтительном варианте осуществления настоящего изобретения указанную вторую замену буфера проводят непрерывным потоком фильтрации через мембрану, отсекающую соединения с молекулярной массой 100-1000 кДа, предпочтительно 300 кДа, в котором предпочтительно заменяют примерно 10-кратный объем указанной смеси, и также предпочтительно скорость проникающего потока регулируют примерно до 100 л/(м²•ч).

В еще одном варианте осуществления настоящего изобретения указанный способ включает концентрирование указанных вирусоподобных частиц, причем предпочтительно указанное концентрирование проводят до конечной концентрации указанных вирусоподобных частиц в указанной композиции 1-5 мг белка/мл, предпочтительно примерно 2,5 мг белка/мл, причем предпочтительно указанную концентрацию определяют методом анализа белка Bradford, и затем предпочтительно указанные вирусоподобные частицы растворяют во втором указанном буфере. В весьма предпочтительном варианте осуществления настоящего изобретения указанное концентрирование проводят через мембрану, способную удерживать указанные вирусоподобные частицы, причем предпочтительно молекулярная масса соединений, отсекаемых мембраной, составляет 100-1000 кДа, предпочтительно примерно 300 кДа, и в котором также предпочтительно указанное концентрирование проводят со скоростью проникающего через мембрану потока менее 100 л/(м²•ч), предпочтительно примерно 30 л/(м²•ч). Низкие скорости потока на стадии концентрирования предупреждают осаждение продукта.

В еще одном предпочтительном варианте осуществления настоящего изобретения указанный способ также включает стадию стерильной фильтрации указанных вирусоподобных частиц, причем предпочтительно указанные вирусоподобные частицы содержатся в указанном втором буфере, также предпочтительно указанную стерильную фильтрацию проводят через

мембранный фильтр с размером пор 0,1-0,45 мкм, предпочтительно примерно 0,22 мкм.

5 В еще одном предпочтительном варианте осуществления настоящего изобретения способ по настоящему изобретению для получения композиции, включающей: (i) вирусоподобные частицы, причем указанные вирусоподобные частицы являются вирусоподобными частицами РНК-содержащего
10 бактериофага, и (ii) олигонуклеотид, причем указанный олигонуклеотид упакован в указанные вирусоподобные частицы, обеспечивает выход белка, причем указанный выход белка составляет по меньшей мере 50%,
15 предпочтительно по меньшей мере 60%, более предпочтительно по меньшей мере 70%, еще более предпочтительно по меньшей мере 75%, и наиболее предпочтительно по меньшей мере 80%.

20 В еще одном предпочтительном варианте осуществления настоящего изобретения способ настоящему изобретению для получения композиции, включающей: (i) вирусоподобные частицы, причем указанные вирусоподобные частицы являются вирусоподобными частицами РНК-содержащего
25 бактериофага, и (ii) олигонуклеотид, причем указанный олигонуклеотид упакован в указанные вирусоподобные частицы, обеспечивает выход олигонуклеотида, причем указанный выход олигонуклеотида составляет по
30 меньшей мере 50%, предпочтительно по меньшей мере 60%, более предпочтительно по меньшей мере 70%, еще более предпочтительно по меньшей мере 75%, и наиболее предпочтительно по меньшей мере 80%.

35 В еще одном предпочтительном варианте осуществления настоящего изобретения указанная композиция, включающая указанные вирусоподобные частицы, обладает чистотой, равной по меньшей мере 80%, предпочтительно по
40 меньшей мере 90%, более предпочтительно по меньшей мере 95%, еще более предпочтительно по меньшей мере 98%, и наиболее предпочтительно по меньшей мере 99%.

45 В другом предпочтительном варианте осуществления настоящего изобретения способ по настоящему изобретению для получения композиции, включающей: (i) вирусоподобные частицы, причем указанные вирусоподобные частицы являются вирусоподобными частицами РНК-содержащего
50 бактериофага, и (ii) олигонуклеотид, причем указанный олигонуклеотид упакован в указанные вирусоподобные частицы, обеспечивает выход

олигонуклеотида, причем указанный выход олигонуклеотида составляет по меньшей мере 50%, предпочтительно по меньшей мере 60%, более предпочтительно по меньшей мере 70%, еще более предпочтительно по меньшей мере 75%, и наиболее предпочтительно по меньшей мере 80%.

В другом предпочтительном варианте осуществления настоящего изобретения способ по настоящему изобретению для получения композиции, включающей: (i) вирусоподобные частицы, причем указанные вирусоподобные частицы являются вирусоподобными частицами РНК-содержащего бактериофага, и (ii) олигонуклеотид, причем указанный олигонуклеотид упакован в указанные вирусоподобные частицы, обеспечивает выход белка, причем указанный выход белка составляет по меньшей мере 50%, предпочтительно по меньшей мере 60%, более предпочтительно по меньшей мере 70%, еще более предпочтительно по меньшей мере 75%, и наиболее предпочтительно по меньшей мере 80%.

В одном из предпочтительных вариантов осуществления настоящего изобретения указанная композиция, включающая указанные вирусоподобные частицы, содержит 15-30 маг, предпочтительно 20-25 маг, и наиболее предпочтительно примерно 20 маг указанного олигонуклеотида на 100 маг белка оболочки, причем предпочтительно указанные вирусоподобные частицы являются указанными вирусоподобными частицами бактериофага Q β , также предпочтительно указанным олигонуклеотидом является олигонуклеотид G10 (SEQ ID NO:8), кроме того, предпочтительно указанная композиция, включающая указанные вирусоподобные частицы, обладает чистотой по меньшей мере 98%, предпочтительно по меньшей мере 99%, также предпочтительно, чтобы подсчет указанного белка оболочки проводили методом оценки белка Bradford, кроме того, предпочтительно, чтобы подсчет содержания указанного олигонуклеотида проводили методом, близким или полностью совпадающим с методом, описанным в примере 9.

Настоящее изобретение также относится к применению нуклеотидной композиции, получаемой по какому-либо из способов настоящего изобретения, в способе получения композиции, включающей: (i) вирусоподобные частицы, причем указанные вирусоподобные частицы являются вирусоподобными частицами РНК-содержащего бактериофага, и (ii) олигонуклеотид, причем предпочтительно указанный способ включает стадии: (a) обеспечения белка

оболочки указанного РНК-содержащего бактериофага, (б) обеспечения
указанной нуклеотидной композиции, (в) получения смеси, причем указанная
смесь включает: (i) указанный белок оболочки, (ii) агент, способный
предупреждать самосборку указанного белка оболочки, (iii) указанный
олигонуклеотид, (г) удаления указанного агента из указанной смеси, и (д)
допущения самосборки указанного белка оболочки в вирусоподобные частицы,
причем предпочтительно указанный олигонуклеотид, содержащийся в указанной
композиции, характеризуется относительным временем начала выхода пика 50-
110%, кроме того, также предпочтительно указанный РНК-содержащий
бактериофаг является бактериофагом Q β , а также предпочтительно указанный
олигонуклеотид является олигонуклеотидом G10 (SEQ ID NO:8).

Настоящее изобретение также относится к применению олигонуклеотида,
который характеризуется относительным временем начала выхода пика 50-110%,
в способе получения композиции, включающей: (i) вирусоподобные частицы,
причем указанные вирусоподобные частицы являются вирусоподобными
частицами РНК-содержащего бактериофага, и (ii) олигонуклеотид, причем
указанный олигонуклеотид упакован в указанные вирусоподобные частицы,
причем предпочтительно указанный способ включает стадии: (а) обеспечения
белка оболочки указанного РНК-содержащего бактериофага, (б) обеспечения
указанного нуклеотида, (в) получения смеси, причем указанная смесь включает:
(i) указанный белок оболочки, (ii) агент, способный предупреждать самосборку
указанного белка оболочки, (iii) указанный олигонуклеотид, (г) удаления
указанного агента из указанной смеси, и (д) допущения самосборки указанного
белка оболочки в вирусоподобные частицы, причем предпочтительно указанный
РНК-содержащий бактериофаг является бактериофагом Q β , а также
предпочтительно указанный олигонуклеотид является олигонуклеотидом G10
(SEQ ID NO:8).

Настоящее изобретение также связано с композицией, получаемой одним из
способов настоящего изобретения, причем указанная композиция включает: (i)
вирусоподобные частицы, причем указанные вирусоподобные частицы являются
вирусоподобными частицами РНК-содержащего бактериофага, и (ii)
олигонуклеотид, причем указанный олигонуклеотид упакован в указанные
вирусоподобные частицы, причем предпочтительно указанный РНК-содержащий
бактериофаг является бактериофагом Q β , также предпочтительно указанный

олигонуклеотид является олигонуклеотидом G10 (SEQ ID NO:8), и, кроме того, предпочтительно чистота указанной композиции составляет по меньшей мере 80%, предпочтительно по меньшей мере 90%, более предпочтительно по 5 меньшей мере 95%, еще более предпочтительно по меньшей мере 98% и наиболее предпочтительно по меньшей мере 99%, и, кроме того, предпочтительно указанная композиция, включающая вирусоподобные частицы, 10 содержит 15-30 маг, предпочтительно 20-25 маг, и наиболее предпочтительно примерно 20 маг указанного олигонуклеотида на 100 маг белка оболочки.

Настоящее изобретение также связано с композицией, получаемой одним из 15 способов настоящего изобретения, причем указанная композиция включает: (i) вирусоподобные частицы, причем указанные вирусоподобные частицы являются вирусоподобными частицами РНК-содержащего бактериофага, и (ii) 20 олигонуклеотид, причем указанный олигонуклеотид упакован в указанные вирусоподобные частицы, причем предпочтительно указанный РНК-содержащий бактериофаг является бактериофагом Q β , также предпочтительно указанный олигонуклеотид является олигонуклеотидом G10 (SEQ ID NO:8), и, кроме того, 25 предпочтительно чистота указанной композиции составляет по меньшей мере 80%, предпочтительно по меньшей мере 90%, более предпочтительно по меньшей мере 95%, еще более предпочтительно по меньшей мере 98% и 30 наиболее предпочтительно по меньшей мере 99%, и, кроме того, указанный олигонуклеотид не подвержен гидролизу ДНКазой.

Примеры

Пример 1. Дезагрегация и агрегация олигонуклеотида G10 (SEQ ID NO:8)

Количественная оценка G10: количество G10 подсчитывают по УФ-абсорбции при 260 нм, выверенной по абсорбции при 340 нм, причем 1 $A_{260-340}$ 35 соответствует концентрации 27,8 мкг/мл при толщине кюветы 1 см.

Дезагрегация (в объеме 10,0 мл, 260 мкМ G10, 25 мМ NaOH, 50°C, 70 мин):

45,91 мг G10 взвешивают в пробирку объемом 15 мл. Порошок растворяют в 11,0 мл очищенной воды ($c = 325,3$ мкМ, по данным спектрометрии). 8,0 мл 45 раствора олигонуклеотида смешивают с 250 мкл 1 М NaOH и 1,75 мл очищенной воды в пробирке объемом 15 мл (260 мкМ G10, 25 мМ NaOH). Смесь дезагрегируют в течение 70 мин при 50°C на водяной базе. После охлаждения 50 раствора на льду pH подводят, добавляя 0,5 М HCl до pH 5,31, 540 мкл 0,5 М HCl и 5 мкл 1 М NaOH.

Агрегация (в объеме 10,0, 175 мкМ G10, 250 мМ Na⁺, 85°C, 9-24 мин): 7,1 мл дезагрегированного раствора олигонуклеотида G10, 2,13 мл очищенной воды и 770 мкл 3 М NaCl смешивают в пробирке объемом 15 мл (175 мкМ олиго, 250 мМ Na⁺). Смесь инкубируют в течение 9 мин при 85°C на водяной бане. Раствор охлаждают на льду/водяной бане и хранят на льду до использования. Раствор агрегированного олигонуклеотида должен быть использован в течение 3 ч после приготовления.

Пример 2. Дезагрегирование и агрегирование олигонуклеотидов G4-4

Дезагрегация: Приготавливают 260 мкМ раствор олигонуклеотида G4-4 (SEQ ID NO:2) и 25 мМ NaOH в очищенной воде. Раствор нагревают до 50 °C в течение 70 мин и затем охлаждают на льду, pH раствора доводят до pH 5-8, используя 0,5 М HCl.

Агрегация: Раствор, включающий дезагрегированный олигонуклеотид G4-4, разводят очищенной водой и 3 М NaCl до конечной концентрации 230 мкМ G4-4 и 250 мМ Na⁺. Смесь нагревают до 80°C, постепенно нагревая по 6,8°C/мин в течение нескольких минут (2-7 мин). После инкубирования смесь постепенно охлаждают до 0-2°C, охлаждая со скоростью 6,8°C/мин.

Анализ продукта методом эксклюзионной ВЭЖХ (см. пример 4) показывает, что получен агрегированный олигонуклеотид (относительное время начала выхода пика: 88%).

Пример 3. Дезагрегация и агрегация олигонуклеотидов

Дезагрегация: Приготавливают раствор 260 мМ олигонуклеотида G5-5 (SEQ ID NO:3), G6-6 (SEQ ID NO:4), G7-7 (SEQ ID NO:5), G8-8 (SEQ ID NO:6), G9-9 (SEQ ID NO:7) и G11 (SEQ ID NO:9), соответственно, и 25 мМ NaOH в очищенной воде. Раствор нагревают до 50°C в течение 70 мин и затем охлаждают на льду, pH раствора доводят до pH 5-8, используя 0,5 М HCl.

Агрегация: Раствор, включающий дезагрегированный олигонуклеотид, разводят очищенной водой и 3 М NaCl до конечной концентрации 230 мкМ олигонуклеотида и 250 мМ Na⁺. Смесь нагревают до 80°C, постепенно нагревая по 6,8°C/мин в течение нескольких минут (2-7 мин). После инкубирования смесь постепенно охлаждают до 0-2°C, охлаждая со скоростью 6,8°C/мин.

Продукт процесса агрегации анализируют эксклюзионной ВЭЖХ (см. пример 4).

Пример 4. Анализ состояния агрегирования олигонуклеотида G10
эксклюзионной ВЭЖХ

Состояние агрегирования олигонуклеотида G10 анализируют с помощью аналитической эксклюзионной ВЭЖХ в следующих условиях:

Колонка: TSKgel 5000 PWWL 7,8 мм • 30,0 см (партия: 5PWX06GNMH3304, номер в каталоге: 08023, фирма Tosoh Bioscience)

Элюент: ФСБ (150 мМ NaCl в 20 мМ буфере с фосфатом натрия, pH 7,2)

Объем впрыскивания: 40,0 мкл (предпочтительно включает концентрацию примерно 20-500 мкМ)

Скорость потока: 0,8 мл/мин

Градиент: изократический

Время пробега: 20 мин

Длина волны: 215, 260 и 280 нм, приводятся данные при 260 нм

Поддержание температуры колонки: 25°C

Температура автоматической пипетки: 8°C.

Капсид бактериофага Q β используют в качестве стандарта.

Время начала выхода пика X% олигонуклеотида G10 относительно капсида Q β (относительное время начала выхода пика Q β) подсчитывают следующим образом: $X\% = \frac{\text{время начала выхода пика [мин] олигонуклеотида}}{\text{время удержания стандарта капсида Q\beta [мин]} \times 100\%$, причем время начала выхода пика олигонуклеотида определяют в качестве времени, при котором элюция олигонуклеотида становится выявляемой, и при котором время удержания стандарта капсида Q β определяют в качестве времени появления максимального пика стандарта. Пример профиля элюции олигонуклеотида G10 и капсида бактериофага Q β в качестве стандарта отображен на фиг. 1.

Основываясь на хроматограммах, показанных на фиг. 1, рассчитали, что относительное время начала выхода пика для агрегированного олигонуклеотида составляет 88%.

Пример 5. Сравнение относительного времени начала выхода пика
необработанного, дезагрегированного и агрегированного олигонуклеотида G10

Относительное время начала выхода пика дезагрегированного и агрегированного олигонуклеотида G10, полученных методом, в основном равным методу, описанному в примере 1, определяют и сравнивают с

относительным временем начала выхода пика необработанного олигонуклеотида G10, полученного от коммерческой фирмы. Деагрегированный олигонуклеотид G10 показывает относительное время начала выхода пика 138% (136,9 – 140,3%,
5 $n = 5$). Препараты G10, которые не подвергались деагрегации/агрегации, согласно описанию в примере 1, показывают относительное время начала выхода пика в том же диапазоне, что и у деагрегированного олигонуклеотида G10. После деагрегации и агрегации время начала выхода пика
10 олигонуклеотида G10 составляет 88%.

Пример 6. Значение стадии деагрегации

15 Необработанный олигонуклеотид G10 и деагрегированный олигонуклеотид G10, описанные в примере 1, агрегируют согласно описанию в примере 1, причем для последующей агрегации выбирают условия: 175 мкМ G10, 250 мМ Na^+ (при добавлении 3 М NaCl), инкубирование при 85°C в течение 16 мин,
20 затем охлаждение на льду. Оба препарата анализируют эксклюзионной ВЭЖХ (см. пример 4), используя капсид бактериофага Q β и необработанный G10 в качестве стандарта. Полученные хроматограммы ВЭЖХ показывают на фиг. 2.

25 Необработанный G10, содержащий агрегированный G10 (см. фиг. 2А и 2 Б, рамка 1). Агрегированный G10, который не деагрегируют перед агрегированием, показывает равную или повышенную молекулярную массу по сравнению с капсидом Q β (фиг. 2А, рамка 2). Относительное время начала
30 выхода пика составляет примерно 75%. Агрегированный G10, который деагрегируют перед агрегированием, проявляет пониженную молекулярную массу по сравнению с капсидом Q β (фиг. 2Б, рамка 2). Относительное время
35 начала выхода пика составляет примерно 88%.

Пример 7. Анализ агрегированного состояния олигонуклеотида G10 методом кругового дихроизма

40 CD спектры необработанного, деагрегированного и агрегированного G10 (полученных в основном по описанию, изложенному в примере 1), а также капсид Q β , упакованный G10 (Q β G10, полученный согласно описанию в примере
45 10), анализируют и записывают в диапазоне 200-300 нм на спектрофотометре JASCO J-715 (фиг. 3). Спектр агрегированного олигонуклеотида G10 отличается четкой положительной полосой (высокой эллиптической) с максимумом при 262 нм и спадом при 240 нм. Установлено, что эти сигналы соответствуют
50 типичному спектру тетраплексов ДНК с параллельной ориентацией цепей (Lu и

др., Biochemistry 31, 1992, с.2455). Важно, что форма CD спектра в области 250-300 нм не изменяется в спектрах ВПЧ, заново собранных в присутствии агрегированного G10. Таким образом, при упаковке G10 не претерпевает конформационного изменения. Небольшое увеличение амплитуды при 262 нм возможно отражает избирательную упаковку агрегированного G10 в капсид Q β , приводящую к повышенной пропорции тетраплексов после упаковки по сравнению с агрегированным G10, который все еще содержит фракцию неагрегированных молекул. Напротив, спектр необработанного G10 отличается низкой эллиптичностью и отсутствием выраженного максимума, что свидетельствует об утрате определенных вторичных и третичных структурных элементов. Низкие сигналы CD, также наблюдаемые для дезагрегированного G10 даже, несмотря на наличие максимума при 295 нм и минимума при 262 нм, может отражать наличие некоторых антипараллельных тетраплексных конформеров (Р. Balagurumoorthy и др., Nucleic Acids Research 20, 1992, с. 406).

Пример 8. Упаковка ВПЧ бактериофага Q β олигонуклеотидом G10 путем разборки/сборки

Дезагрегация ВПЧ Q β : 45 мг ВПЧ Q β (2,5 мг/мл, по определению методом Bradford) в ФСБ (20 мМ фосфат, 150 мМ NaCl, pH 7,5), восстанавливают с помощью 10 мМ ДТЭ в течение 15 мин при комнатной температуре при перемешивании. Затем добавляют хлорид магния до конечной концентрации 0,7 М и продолжают инкубировать в течение 15 мин при комнатной температуре при перемешивании, что приводит к осаждению РНК, инкапсулированной в клетках-хозяевах, и сопутствующему распаду ВПЧ. Раствор центрифугируют 10 мин при 4000 об/мин при 4°C (центрифуга Eppendorf 5810 R с угловым фиксированным ротором А-4-62, используемая на всех последующих стадиях) для удаления осажденной РНК из раствора. Надосадочную жидкость, содержащую высвободившийся димерный белок оболочки Q β , применяют для стадий хроматографической очистки.

Очистка белка оболочки Q β с помощью катионообменной хроматографии и эксклюзионной хроматографии: надосадочная жидкость реакции разборки, содержащая димерный белок оболочки, белки клетки-хозяина и остаточную РНК клетки-хозяина, загружают в колонку SP-Sepharose FF (хк16/20, 6 мл, фирма Amersham Bioscience). Колонку уравнивают 20 мМ буфером натрия

фосфата, pH 7, и образец разводят 1:15 в воде для регуляции проводимости ниже 10 мS/см для достижения желаемого связывания белка оболочки на колонке.

Элюция связанного белка оболочки дополняется стадией ступенчатого градиента до 20 мМ фосфата натрия/500 мМ хлорида натрия, и белок собирают при объеме фракций примерно 25 мл. Хроматографию проводят при комнатной температуре при скорости потока 5 мл/мин на протяжении всех стадий, и поглощение подвергают мониторингу при 260 нм и 280 нм. На второй стадии выделенный белок оболочки Q β (элюированная фракция с катионно-обменной колонки) загружают в колонку Sephacryl S-100 HR (хк26/60, 320 мл, фирма Amersham Bioscience), уравновешенную 20 мМ фосфата натрия/250 мМ хлорида натрия, pH 7,2. Хроматографию проводят при комнатной температуре при скорости потока 2,5 мл/мин, а поглощение подвергают мониторингу при 260 нм и 280 нм. Собирают фракции объемом 5 мл.

Описание очищенного белка оболочки бактериофага Q β с помощью аналитической эксклюзионной хроматографии: образец очищенного белка оболочки Q β исследуют аналитической эксклюзионной хроматографией (фиг. 1В) и сравнивают с i) интактными Q β ВПЧ (фиг. 4А), которые выделяют и очищают из лизата *E. coli* и которые используют в качестве исходного материала для процедуры очистки, и с ii) надосадочной жидкостью в реакции разборки (фиг. 4В). Эффективное разделение молекул РНК и белка оболочки показано по отсутствию какого-либо РНК-подобного пика (типичное соотношение A280/A260 = 0,5) на фиг. 4В и наличия единственного пика, напоминающего белок (типичное соотношение A280/A260 = 1,7).

Сборка Q β G10 путем двойной фильтрации: Очищенный белок оболочки (в 20 мМ фосфате натрия, pH 7,2, 250 мМ NaCl) смешивают с водой и исходными растворами мочевины, NaCl, ДТЭ и агрегированного олигонуклеотида G10 (полученного в значительной степени тем же способом, который был описан в примере 1). Объем смеси составляет 50 мл и конечные концентрации компонентов составляют 1 мг/мл белка оболочки, 1,0 М мочевины, 250 мМ NaCl, 2,5 мМ ДТЭ и 0,24 мг/мл G10. Затем раствор подвергают двойной фильтрации при комнатной температуре против 300 мл 20 мМ фосфата натрия, 250 мМ NaCl pH 7,2, используя картридж, отсекающий соединения с молекулярной массой 30 кДа (прибор Pellicon XL, фирма Millipore), скорости поперечного потока 10 мл/мин и скорости проникающего потока 2,5 мл/мин. H₂O₂ добавляют до

конечной концентрации 7 мМ и раствор инкубируют в течение 1 ч при комнатной температуре для индукции формирования дисульфидных связей. Раствор затем подвергают двойной фильтрации против 500 мл 20 мМ фосфата натрия, 150 мМ NaCl pH 7,2, используя картридж, отсекающий соединения с молекулярной массой 300 кДа (прибор Pellicon XL, фирма Millipore), скорости поперечного потока 10 мл/мин и скорости проникающего потока 2,5 мл/мин, для удаления избытка H₂O₂ и неупакованных олигонуклеотидов G10 из продукта – собранного QβG10.

Пример 9. Анализ продукта упаковки QβG10 и определение выхода способа упаковки

Описание упакованных QβG10 ВПЧ методом аналитической эксклюзионной хроматографии: образец ВПЧ, упакованных QβG10, анализируют эксклюзионной хроматографией (фиг. 5) и сравнивают с интактными ВПЧ бактериофага Qβ, которые выделяют и очищают из лизата *E. coli*. Указанную аналитическую эксклюзионную хроматографию проводят, используя следующие параметры:

Колонка: Bio-Sil SEC 250, 7,8 x 300 мм, № в каталоге 125-0062

Элюент: 50 мМ фосфата натрия pH 6,5, 150 мМ NaCl

Градиент: изократический

Температура колонки: 25°C

Температура автоматической пипетки: 8°C

Скорость потока: 1,0 мл/мин

Концентрация образца: 1,0 мг/мл белка

Объем впрыскивания: 40 мкл

Длина волны: 280 нм

Ширина полосы пропускания: 4 нм

Время пробега: 20 мин

Приготовление образца:

Образец разводят до концентрации 1,0 мг/мл, используя элюент, встряхивают и центрифугируют при 16000 g в течение 10 мин при 4°C.

Наличие правильно собранных ВПЧ в продукте подтверждают подвижкой пика на идентичное время удержания в качестве пика, соответствующего нативным ВПЧ бактериофага Qβ. Наблюдаемый пик ВПЧ QβG10 (фиг. 5г) предпочтительно определяется содержанием нуклеиновой кислоты в ВПЧ,

поскольку коэффициент абсорбция нуклеиновой кислоты при 260 нм более чем в 100 раз выше, чем коэффициент абсорбции белка оболочки. Устанавливают, что соотношение A260/A280 очищенных QβG10 ВПЧ составляет 1,70 (1,65 - 1,76, n = 5), что характерно для олигонуклеотида G10 (A260/A280 = 1,74), а величина соотношения A260/A280 для Qβ ВПЧ составляет 1,87 (1,85-1,90, n = 10), что характерно для РНК.

Описание упакованных QβG10 ВПЧ методом SDS-PAGE: Образец упакованных Qβ G10 анализируют с помощью невосстановительной SDS-PAGE (фиг. 6) и сравнивают с интактными Qβ ВПЧ, которые были выделены и очищены из лизата *E. coli*. Наличие правильно собранных ВПЧ в продукте подтверждают по формированию полос связанных дисульфидными связями пентамерных и гексамерных форм белка оболочки, близких интактным Qβ ВПЧ, показывая правильную структурную сборку единиц белковой оболочки при сборке QβG10 ВПЧ *in vitro*.

Количественная оценка упакованного олигонуклеотид G10: Образцы QβG10 ВПЧ (0,25 мг/мл в ФСБ) обрабатывают 0,1 мМ ТХЭФ (трис(2-хлорэтил)фосфатом) (15 мин при комнатной температуре) для восстановления дисульфидных связей. NaCl добавляют к восстановленным образцам (до конечной концентрации 1 М) и смеси инкубируют в течение 15 мин при 60°C для осаждения белкового содержимого. После центрифугирования образуемые надосадочные жидкости инкубируют в течение 5 мин при 95°C, охлаждают на льду в течение 1 мин и затем измеряют величину A260. Концентрацию олигонуклеотида G10 в надосадочных жидкостях высчитывают по формуле:

$c(G10) \text{ (мг/мл)} = A_{260} \times 1,12 \times 9600 / 344580$, в которой:

1,12 = фактор коррекции содержания соли в образце

9600 = молекулярная масса олигонуклеотида G10

344580 = коэффициент специфической молярной абсорбции олигонуклеотида G10.

Обычно количество упакованного олигонуклеотида G10 составляет 0,2 мг/мг белка оболочки бактериофага Qβ.

Содержание G10 в ВПЧ QβG10 и подсчет величины выхода в реакции упаковки: Агрегированный G10 упаковывают в ВПЧ Qβ путем сборки/повторной сборки ВПЧ методом, описанным в примере 8. 953 мг олигонуклеотида G10

вносят для повторной сборки вместе с 4000 мг очищенного димера Q β . Выход реакции Q β G10 составляет 20 мкг олигонуклеотида G10 на 100 мкг белка (содержание белка определяют методом Bradford или ВЭЖХ). Выход G10 в реакции упаковки составляет 63% при выходе белка 75%.

Пример 10. Сборка Q β G10 с помощью двойной фильтрации и определение выхода

Очищенный белок оболочки Q β получают в значительной степени методом, описанным в примере 8. Белок оболочки в 20 mM натрия фосфата pH 7,2, 250 mM NaCl смешивают с водой и исходные растворы мочевины, NaCl, ДТЭ и агрегированного олигонуклеотида G10 (полученного в значительной степени методом, описанным в примере 1, относительное время начала выхода пика дезагрегированного G10 составляет 135%, относительное время начала выхода пика агрегированного G10 составляет 88%). Объем смеси составляет 1,6 л и конечные концентрации компонентов составляют 2,5 мг/мл белка оболочки, 1,0 M мочевины, 250 mM NaCl, 2,5 mM ДТЭ и 0,6 мг/мл G10. Раствор затем подвергают двойной фильтрации при комнатной температуре против 9,6 л 20 mM фосфата натрия 250 mM NaCl pH 7,2, используя картридж, отсекающий соединения с массой 30 кДа (прибор Pellicon Mini2, площадь фильтрации 0,1 м², фирма Millipore), при скорости поперечного потока 384 л/(м²•ч) и скорости проникающего потока 96 л/(м²•ч). H₂O₂ добавляют до конечной концентрации 2 mM и раствор инкубируют в течение 1 ч при комнатной температуре для индукции образования дисульфидных связей. Затем раствор подвергают двойной фильтрации против 16 л 20 mM фосфата натрия 150 mM NaCl pH 7,2, используя картридж, отсекающий соединения с массой 300 кДа (продукт Pellicon Mini 2, площадь фильтрации 0,1 м², фирма Millipore), при скорости поперечного потока 300 л/(ч•м²) и скорости проникающего потока 100 л/(ч•м²) для удаления избытка H₂O₂ и неупакованных олигонуклеотидов G10 из собранного продукта Q β G10. Продукт концентрируют до 2,5 мг/мл проточной фильтрацией вдоль потока через фильтр с порами 0,22 мкм. Основные стадии способа суммированы в табл. 1.

Таблица 1. Краткое описание стадий способа сборки и очистки QβG10.

Стадии способа	Параметры	Результат стадии способа
Дезагрегация G10	Концентрация G10: 260 мкМ Концентрация NaOH: 25 мМ Температура: 50°C Время нагревания: 70 мин Масштаб: 1,1 г G10, V = 440 мл (в аликвотах по 10 мл)	Относительное время начала выхода пика олигонуклеотида G10: 138%
Нейтрализация раствора дезагрегированного G10	Используемая кислота: 0,5 М H ₃ PO ₄	pH 7,2
Реагрегация раствора G10	Концентрация G10: 175 мкМ Концентрация Na ⁺ : 250 мМ Температура: 85°C Время нагревания: 10 мин Масштаб: 1,1 г G10, V = 654 мл (в аликвотах по 10 мл)	Относительное время начала выхода пика олигонуклеотида G10: 88%
Оттаивание исходного материала	Температура: 22°C	Раствор димера Qβ
Приготовление смеси для повторной сборки.	Концентрация димера: 2,5 мг/мл Концентрация мочевины: 1 М Концентрация ДТЭ: 2,5 мМ Концентрация G10: 62,5 мкМ Время перемешивания: 60 ± 10 мин Температура: 22 ± 3°C Масштаб: 4 г димера Qβ, V = 1,6 л	Раствор для двойной фильтрации 1
Непрерывная двойная фильтрация 1	Мембрана: 30 кДа MWCO Площадь: 0,1 м ² Объемы двойной фильтрации: 6 (9,6 л собранного проникшего раствора) Буфер: NaP250 pH 7,2 Целевая длительность: 60 мин Температура: 22°C Поток: 96 л/(м ² •ч) V = 1,6 л	Димер Qбета формирует ВПЧ вокруг сердцевинного материала G10 из-за удаления мочевины и ДТЭ.
Окисление перекисью водорода	Концентрация H ₂ O ₂ : 2 мМ Температура: 22°C Длительность реакции: 60 ± 10 мин V = 1,6 л	Формирование дисульфидных мостиков и за счет этого стабилизация ВПЧ

Стадии способа	Параметры	Результат стадии способа
Непрерывная двойная фильтрация 2	Мембрана: 300 кДа MWCO Площадь: 0,1 м ² Объемы двойной фильтрации: 10 (16 л) Буфер: фармацевтически приемлемый буфер Температура: 22 ± 3°C Поток: 100 л/(ч•м ²) V=1,6 л	Удаление остаточного количества пероксида водорода и остаточного неупакованного олигонуклеотида G10.
Концентрация QbG10	Мембрана: 300 кДа MWCO Площадь: 0,1 м ² Температура: 22 ± 3°C Проникающий поток: < 100 л/(ч•м ²) V = 1,2 л	Концентрация = 2,5 мг/мл
Фильтрация QbG10	Мембранный фильтр PES с диаметром пор 0,22 мкм	Снижение бионагрузки

Чистота продукта, определенная эксклюзионной хроматографией, составляет 99,28%, т.е. пик QbG10 достигает 99,28% полной площади пика на хроматограмме согласно описанию в примере 4. Выход белка и выход олигонуклеотида определяют методом, описанным в примере 8. Выход белка в результате полного завершения способа составляет 75%. Выход олигонуклеотида в результате полного завершения способа составляет 75%.

Пример 11. Воздействие стадии агрегирования G10 на способ сборки

Если G10 с относительным временем начала выхода пика 139% используют в способе сборки согласно описанию в примере 8, формируются всего лишь незначительные количества GbG10, а продукт ВПЧ не может быть выделен.

Пример 12. Упаковка ВПЧ бактериофагов AP205 и GA355 олигонуклеотидом G10 в результате разборки/повторной сборки

Дезагрегация: 50-100 мг ВПЧ бактериофагов AP205 и GA355 (количество которых определяют методом Bradford) в буфере А (5 мМ NaPO₄ pH 6,8, 100 мМ NaCl, 2 мМ MgCl₂) инкубируют при 30°C в течение 16 ч с РНКазой А (фирма Sigma) и бензоназой (фирма Novagen) в концентрации 1 мг/мл и 5 Ед/мл, соответственно. В случае ВПЧ AP205 дезоксигенирование внутренних дисульфидных связей проводят, предупреждая добавление РНКазы А и бензоназы добавлением 20 мМ ДТЭ с последующим инкубированием в течение 30 мин при 37°C. После добавления 1 М NaCl осаждение белков вирусной оболочки индуцируют инкубированием в течение 15 мин при 70°C. Осажденные

белки оболочки собирают центрифугированием в течение 10 мин, при 27000 g при 4°C. Надосадочную жидкость, содержащую РНКазу, бензоназу и разрушенные нуклеиновые кислоты, выбрасывают. Осадки ресуспендируют в 5 буфере Б (20 mM NaPO₄ pH 7,2, 6 M мочевины) и инкубируют в течение 10 мин при комнатной температуре.

Очистка белков оболочки с помощью катионообменной хроматографии:

10 Растворы осветляют центрифугированием в течение 10 мин в режиме 27000 g при 4°C. Ненужный осадок выбрасывают. Надосадочную жидкость, содержащую разобранные белки оболочки, вносят в колонку SP Sepharose™ FF column 15 (16/20, фирма Amersham Biosciences), уравновешенную буфером Б (20 mM NaPO₄ pH 7,2, 6 M мочевины). Промывной поток выбрасывают. После интенсивного промывания буфером Б (15 объемами колонки) колонку выверяют линейным 20 градиентом от буфера Б до буфера В (20 mM NaPO₄ pH 7,2, 1 M мочевины) при градиенте 37,5 объемов колонки. Во время загрузки, промывки и элюции проводят мониторинг поглощения при 254 нм и 280 нм. Белки оболочки элюируют буфером Г (20 mM NaPO₄ pH 6,5, 1 M мочевины, 300 mM NaCl) в виде 25 одной фракции и анализируют методом LDS-PAGE с последующим окрашиванием красителем кумаси. Элюированные фракции белка хранят при 4°C в качестве «разобранного белка оболочки». Концентрацию белка 30 определяют методом Bradford.

Повторная сборка: Очищенный белок оболочки бактериофагов AP205 или GA355 используют с пятикратным избытком (мас./мас.) по отношению к 35 олигонуклеотиду G10. Белки оболочки смешивают с олигонуклеотидом G10 в буфере для повторной сборки, содержащем 1 M мочевины и 2,5 mM ДТЭ, и инкубируют в течение 1 ч при комнатной температуре. После инкубирования смесь повторной сборки диализируют в течение 24 ч против 5 л ФСБ. 40 Сформировавшуюся суспензию центрифугируют в течение 10 мин в режиме 27000 g при 4°C. Ненужный остаток выбрасывают. Надосадочная жидкость содержит заново собранные и упакованные ВПЧ. Концентрацию белка 45 определяют методом Bradford и заново собранные и упакованные ВПЧ концентрируют центрифугирующими фильтрующими устройствами (Amicon Ultra 15, 10K MWCO).

50 Очистка заново собранных и упакованных ВПЧ: до 25 мг общего белка загружают в колонку Sepharose™ CL-4B (26/60, фирма Amersham Biosciences),

уравновешенную ФСБ. Эксклюзионную хроматографию проводят с применением уравновешивающего буфера при комнатной температуре со скоростью потока 1,25 мл/мин. Во время элюирования проводят мониторинг поглощения при 254 нм и 260 нм. Выделяют два пика. Большому высокомолекулярному пику предшествует малый пик меньшей молекулярной массы. Большой пик представляет молекулярную массу, которая соответствует очищенным ВПЧ, что показано методом SE-ВЭЖХ. Анализ ВПЧ AP205 или GA355, упакованных олигонуклеотидом G10, проводят методом, практически равным методу, описанному в примере 16 патента WO03/024481 (с. 131 и далее).

Пример 13. Упаковка ВПЧ бактериофага FR олигонуклеотидом G10 с помощью разборки/повторной сборки

Дезагрегация: 50-100 мг ВПЧ бактериофага FR (определенная методом Bradford) в буфере А (5 мМ NaPO₄ pH 6,8, 100 мМ NaCl, 2 мМ MgCl₂) инкубируют при 30°C в течение 16 ч с РНКазой А (фирма Sigma) и бензоназой (фирма Novagen) в количестве 1 мг/мл и 5 Ед/мл, соответственно. После добавления 1 М NaCl индуцируют осаждение белков оболочки путем 15-минутного инкубирования при 70°C. Осажденные белки оболочки концентрируют центрифугированием в течение 10 мин в режиме 27000 g при 4°C. Надосадочную жидкость, содержащую РНКазу А, бензоназу и разрушенные нуклеиновые кислоты, выбрасывают. Осадок повторно суспендируют в буфере Б (20 мМ NaPO₄ pH 7,2, 6 М мочевины) и инкубируют в течение 10 мин при комнатной температуре.

Очистка белков оболочки бактериофага FR с помощью катионообменной хроматографии: раствор осветляют центрифугированием в течение 10 мин в режиме 27000 g при 4°C. Незначительный осадок выбрасывают и надосадочную жидкость, содержащую разобранные белки оболочки, загружают в колонку SP Sepharose™ FF (16/20, фирма Amersham Biosciences), уравновешенную буфером Б. Промывной поток выбрасывают. После интенсивного промывания буфером Б (15 объемов колонки) колонку уравнивают линейным градиентом от буфера Б до буфера В (20 мМ NaPO₄ pH 7,2, 1 М мочевины) при градиенте 37,5 объемов колонки. Во время загрузки, промывки и элюции проводят мониторинг поглощения при 254 нм и 280 нм. Белки оболочки элюируют буфером Г (20 мМ NaPO₄ pH 6,5, 1 М мочевина, 300 мМ NaCl) в виде одной фракции и анализируют методом LDS-PAGE с последующим окрашиванием красителем

кумасы. Элюированные фракции белка хранят при 4°C в качестве «разобранного белка оболочки». Концентрацию белка определяют методом Bradford.

Повторная сборка: Очищенный белок оболочки бактериофага FR используют с пятикратным избытком (мас./масс.) по отношению к олигонуклеотиду G10. Белок оболочки бактериофага FR смешивают с олигонуклеотидом G10 в буфере повторной сборки, содержащем 1 М мочевины и 2,5 мМ ДТЭ, и инкубируют в течение 1 ч при комнатной температуре. После инкубирования смесь повторной сборки диализируют в течение 24 ч против 5 л ФСБ. Получаемую суспензию центрифугируют в течение 10 мин, 27000 g при 4°C. Незначительный осадок выбрасывают. Надосадочная жидкость содержит заново собранные и упакованные ВПЧ бактериофага FR. Концентрацию белка определяют методом Bradford, и заново собранные и упакованные ВПЧ бактериофага FR концентрируют с помощью центрифугирующих фильтрующих устройств (Amicon Ultra 15, 10K MWCO).

Очистка и новая сборка упакованных ВПЧ бактериофага FR: до 25 мг общего белка загружают в колонку Sepharose TM CL-4B (26/60, фирма Amersham Biosciences), уравновешенную ФСБ. Эксклюзионную хроматографию проводят с применением уравнивающего буфера при комнатной температуре со скоростью потока 1,25 мл/мин. Во время элюирования проводят мониторинг поглощения при 254 нм и 260 нм. Выделяют два пика. Большому высокомолекулярному пику предшествует малый пик меньшей молекулярной массы. Большой пик представляет молекулярную массу, которая соответствует очищенным ВПЧ FR, что показано методом SE-ВЭЖХ. Анализ ВПЧ FR, упакованных олигонуклеотидом G10, проводят методом, практически равным методу, описанному в примере 16 патента WO03/024481 (с. 131 и далее).

Пример 14. Сборка QβG8 с помощью двойной фильтрации и определение выхода

Очищенный белок оболочки Qβ получают методом, в значительной степени напоминающим метод, описанный в примере 8. Белок оболочки в 20 мМ фосфате натрия pH 7,2, 250 мМ NaCl смешивают с водой и исходными растворами мочевины, NaCl, ДТЭ и агрегированного олигонуклеотида G8 (методом, в значительной степени напоминающим метод, описанный в примере 3, относительное время начала выхода пика дезагрегированного G8 составляет 113%, относительное время начала выхода пика агрегированного G8 составляет

88%). Объем смеси составляет 1,6 л и конечные концентрации компонентов составляют 1 мг/мл белка оболочки, 1,0 М мочевины, 250 мМ NaCl, 2,5 мМ ДТЭ и 0,24 мг/мл G8. Затем раствор дважды фильтруют при комнатной температуре против 9,6 л 20 мМ фосфата натрия, 250 мМ NaCl, pH 7,2, используя картридж, отсекающий соединения с молекулярной массой 30 кДа (прибор Pellicon XL, фирма Millipore), при скорости поперечного потока 384 л/(м²•ч) и скорости проникающего потока 96 л/(м²•ч). H₂O₂ добавляют до конечной концентрации 2 мМ и раствор инкубируют в течение 1 ч при комнатной температуре для индукции формирования дисульфидных связей. Затем раствор дважды фильтруют против 16 л 20 мМ фосфата натрия, 150 мМ NaCl pH 7,2, используя картридж, отсекающий соединения с молекулярной массой 300 кДа (Pellicon Mini 2, площадь фильтрации 0,1 м², фирма Millipore), при скорости поперечного потока 300 л/(м²•ч) и скорости проникающего потока 100 л/(м²•ч), для удаления избытка H₂O₂ и неупакованных олигонуклеотидов G8 из собранного продукта QβG8. Продукт концентрируют до величины 2,5 мг/мл методом проточной фильтрации вдоль потока через фильтр с размером пор 0,22 мкм.

ПЕРЕЧЕНЬ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЕЙ

5 <110> Цитос Биотехнологи АГ
Kinzler, Matthias
Proba, Karl

10 <120> СПОСОБЫ УПАКОВКИ ОЛИГОНУКЛЕОТИДОВ В ВИРУСОПОДОБНЫЕ ЧАСТИЦЫ РНК-
СОДЕРЖАЩИХ БАКТЕРИОФАГОВ

<130> P1070PC00

15 <150> US 60/812,592
<151> 2006-06-12

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

20 <160> 23

<170> PatentIn version 3.3

25 <210> 1
<211> 10
<212> ДНК
<213> искусственная

30 <220>
<223> химически синтезированная

<400> 1
35 gacgacgtc 10

<210> 2
<211> 18
40 <212> ДНК
<213> искусственная

<220>
45 <223> химически синтезированная

<400> 2
gggggacgat cgtcgggg 18

50 <210> 3

	<211> 20	
	<212> ДНК	
	<213> искусственная	
5	<220>	
	<223> химически синтезированная	
	<400> 3	
10	gggggggacga tcgtcggggg	20
	<210> 4	
	<211> 22	
15	<212> ДНК	
	<213> искусственная	
	<220>	
	<223> химически синтезированная	
20	<400> 4	
	ggggggggacg atcgtcgggg gg	22
	<210> 5	
25	<211> 24	
	<212> ДНК	
	<213> искусственная	
30	<220>	
	<223> химически синтезированная	
	<400> 5	
35	gggggggggac gatcgtcggg gggg	24
	<210> 6	
	<211> 26	
40	<212> ДНК	
	<213> искусственная	
	<220>	
	<223> химически синтезированная	
45	<400> 6	
	gggggggggga cgatcgtcgg gggggg	26
	<210> 7	
50	<211> 28	

<212> ДНК
 <213> искусственная
 <220>
 <223> химически синтезированная
 5
 <400> 7
 gggggggggg acgatcgtcg gggggggg 28
 10
 <210> 8
 <211> 30
 <212> ДНК
 <213> искусственная
 15
 <220>
 <223> химически синтезированная
 <400> 8
 20 gggggggggg gacgatcgtc gggggggggg 30
 <210> 9
 <211> 32
 25 <212> ДНК
 <213> искусственная
 <220>
 <223> химически синтезированная
 30
 <400> 9
 gggggggggg ggacgatcgt cggggggggg gg 32
 35
 <210> 10
 <211> 132
 <212> ВЕЛОК
 <213> бактериофаг Qb
 40
 <400> 10
 Ala Lys Leu Glu Thr Val Thr Leu Gly Asn Ile Gly Lys Asp Gly Lys
 1 5 10 15
 45
 Gln Thr Leu Val Leu Asn Pro Arg Gly Val Asn Pro Thr Asn Gly Val
 20 25 30
 50

RU 2476595 C2

Ala Ser Leu Ser Gln Ala Gly Ala Val Pro Ala Leu Glu Lys Arg Val

35

40

45

5

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

15

Asp Pro Ser Val Thr Arg Gln Ala Tyr Ala Asp Val Thr Phe Ser Phe

85

90

95

20

Thr Gln Tyr Ser Thr Asp Glu Glu Arg Ala Phe Val Arg Thr Glu Leu

100

105

110

25

Ala Ala Leu Leu Ala Ser Pro Leu Leu Ile Asp Ala Ile Asp Gln Leu

115

120

125

Asn Pro Ala Tyr

130

30

<210> 11

<211> 329

<212> БЕЛОК

35

<213> бактериофаг Qb

<400> 11

40

Met Ala Lys Leu Glu Thr Val Thr Leu Gly Asn Ile Gly Lys Asp Gly

1

5

10

15

45

Lys Gln Thr Leu Val Leu Asn Pro Arg Gly Val Asn Pro Thr Asn Gly

20

25

30

Val Ala Ser Leu Ser Gln Ala Gly Ala Val Pro Ala Leu Glu Lys Arg

50

35

40

45

Val Thr Val Ser Val Ser Gln Pro Ser Arg Asn Arg Lys Asn Tyr Lys
50 55 60

5 Val Gln Val Lys Ile Gln Asn Pro Thr Ala Cys Thr Ala Asn Gly Ser
65 70 75 80

10 Cys Asp Pro Ser Val Thr Arg Gln Ala Tyr Ala Asp Val Thr Phe Ser
85 90 95

15 Phe Thr Gln Tyr Ser Thr Asp Glu Glu Arg Ala Phe Val Arg Thr Glu
100 105 110

20 Leu Ala Ala Leu Leu Ala Ser Pro Leu Leu Ile Asp Ala Ile Asp Gln
115 120 125

25 Leu Asn Pro Ala Tyr Trp Thr Leu Leu Ile Ala Gly Gly Gly Ser Gly
130 135 140

30 Ser Lys Pro Asp Pro Val Ile Pro Asp Pro Pro Ile Asp Pro Pro Pro
145 150 155 160

35 Gly Thr Gly Lys Tyr Thr Cys Pro Phe Ala Ile Trp Ser Leu Glu Glu
165 170 175

40 Val Tyr Glu Pro Pro Thr Lys Asn Arg Pro Trp Pro Ile Tyr Asn Ala
180 185 190

45 Val Glu Leu Gln Pro Arg Glu Phe Asp Val Ala Leu Lys Asp Leu Leu
195 200 205

50 Gly Asn Thr Lys Trp Arg Asp Trp Asp Ser Arg Leu Ser Tyr Thr Thr
210 215 220

Phe Arg Gly Cys Arg Gly Asn Gly Tyr Ile Asp Leu Asp Ala Thr Tyr

225 230 235 240

5 Leu Ala Thr Asp Gln Ala Met Arg Asp Gln Lys Tyr Asp Ile Arg Glu
245 250 255

10 Gly Lys Lys Pro Gly Ala Phe Gly Asn Ile Glu Arg Phe Ile Tyr Leu
260 265 270

15 Lys Ser Ile Asn Ala Tyr Cys Ser Leu Ser Asp Ile Ala Ala Tyr His
275 280 285

20 Ala Asp Gly Val Ile Val Gly Phe Trp Arg Asp Pro Ser Ser Gly Gly
290 295 300

25 Ala Ile Pro Phe Asp Phe Thr Lys Phe Asp Lys Thr Lys Cys Pro Ile
305 310 315 320

Gln Ala Val Ile Val Val Pro Arg Ala
325

<210> 12
<211> 129
<212> БЕЛОК
<213> бaктерioфaг R17

<400> 12

40 Ala Ser Asn Phe Thr Gln Phe Val Leu Val Asn Asp Gly Gly Thr Gly
1 5 10 15

45 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
35 40 45

Arg Gln Ser Ser Ala Gln Asn Arg Lys Tyr Thr Ile Lys Val Glu Val
50 55 60

5 Pro Lys Val Ala Thr Gln Thr Val Gly Gly Val Glu Leu Pro Val Ala
65 70 75 80

10 Ala Trp Arg Ser Tyr Leu Asn Met Glu Leu Thr Ile Pro Ile Phe Ala
85 90 95

15 Thr Asn Ser Asp Cys Glu Leu Ile Val Lys Ala Met Gln Gly Leu Leu
100 105 110

20 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

30

<212> БЕЛОК

<213> бактериофаг fr

<400> 13

35

Met Ala Ser Asn Phe Glu Glu Phe Val Leu Val Asp Asn Gly Gly Thr
1 5 10 15

40

Gly Asp Val Lys Val Ala Pro Ser Asn Phe Ala Asn Gly Val Ala Glu
20 25 30

45

Trp Ile Ser Ser Asn Ser Arg Ser Gln Ala Tyr Lys Val Thr Cys Ser
35 40 45

50

Val Arg Gln Ser Ser Ala Asn Asn Arg Lys Tyr Thr Val Lys Val Glu
50 55 60

RU 2476595 C2

Val Pro Lys Val Ala Thr Gln Val Gln Gly Gly Val Glu Leu Pro Val
65 70 75 80

5 Ala Ala Trp Arg Ser Tyr Met Asn Met Glu Leu Thr Ile Pro Val Phe
85 90 95

10 Ala Thr Asn Asp Asp Cys Ala Leu Ile Val Lys Ala Leu Gln Gly Thr
100 105 110

15 Phe Lys Thr Gly Asn Pro Ile Ala Thr Ala Ile Ala Ala Asn Ser Gly
115 120 125

Ile Tyr
20 130

<210> 14
<211> 130
25 <212> БЕЛОК
<213> Бактериофаг GA

<400> 14
30

Met Ala Thr Leu Arg Ser Phe Val Leu Val Asp Asn Gly Gly Thr Gly
1 5 10 15

35 Asn Val Thr Val Val Pro Val Ser Asn Ala Asn Gly Val Ala Glu Trp
20 25 30

40 Leu Ser Asn Asn Ser Arg Ser Gln Ala Tyr Arg Val Thr Ala Ser Tyr
35 40 45

45 Arg Ala Ser Gly Ala Asp Lys Arg Lys Tyr Ala Ile Lys Leu Glu Val
50 55 60

Pro Lys Ile Val Thr Gln Val Val Asn Gly Val Glu Leu Pro Gly Ser
50 65 70 75 80

RU 2476595 C2

Ala Trp Lys Ala Tyr Ala Ser Ile Asp Leu Thr Ile Pro Ile Phe Ala
85 90 95

5 Ala Thr Asp Asp Val Thr Val Ile Ser Lys Ser Leu Ala Gly Leu Phe
100 105 110

10 Lys Val Gly Asn Pro Ile Ala Glu Ala Ile Ser Ser Gln Ser Gly Phe
115 120 125

15 Tyr Ala
130

20 <210> 15
<211> 132
<212> БЕЛОК
<213> бактериофаг SP

25 <400> 15

Met Ala Lys Leu Asn Gln Val Thr Leu Ser Lys Ile Gly Lys Asn Gly
1 5 10 15

30 Asp Gln Thr Leu Thr Leu Thr Pro Arg Gly Val Asn Pro Thr Asn Gly
20 25 30

35 Val Ala Ser Leu Ser Glu Ala Gly Ala Val Pro Ala Leu Glu Lys Arg
35 40 45

40 Val Thr Val Ser Val Ala Gln Pro Ser Arg Asn Arg Lys Asn Phe Lys
50 55 60

45 Val Gln Ile Lys Leu Gln Asn Pro Thr Ala Cys Thr Arg Asp Ala Cys
65 70 75 80

50 Asp Pro Ser Val Thr Arg Ser Ala Phe Ala Asp Val Thr Leu Ser Phe

85

90

95

5 Thr Ser Tyr Ser Thr Asp Glu Glu Arg Ala Leu Ile Arg Thr Glu Leu
100 105 110

10 Ala Ala Leu Leu Ala Asp Pro Leu Ile Val Asp Ala Ile Asp Asn Leu
115 120 125

15 Asn Pro Ala Tyr
130

20 <210> 16
<211> 329
<212> БЕЛОК
<213> Бактериофаг SP

<400> 16

25 Ala Lys Leu Asn Gln Val Thr Leu Ser Lys Ile Gly Lys Asn Gly Asp
1 5 10 15

30 Gln Thr Leu Thr Leu Thr Pro Arg Gly Val Asn Pro Thr Asn Gly Val
20 25 30

35 Ala Ser Leu Ser Glu Ala Gly Ala Val Pro Ala Leu Glu Lys Arg Val
35 40 45

40 Thr Val Ser Val Ala Gln Pro Ser Arg Asn Arg Lys Asn Phe Lys Val
50 55 60

45 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

RU 2476595 C2

Ser Tyr Ser Thr Asp Glu Glu Arg Ala Leu Ile Arg Thr Glu Leu Ala
100 105 110

5 Ala Leu Leu Ala Asp Pro Leu Ile Val Asp Ala Ile Asp Asn Leu Asn
115 120 125

10 Pro Ala Tyr Trp Ala Ala Leu Leu Val Ala Ser Ser Gly Gly Gly Asp
130 135 140

15 Asn Pro Ser Asp Pro Asp Val Pro Val Val Pro Asp Val Lys Pro Pro
145 150 155 160

20 Asp Gly Thr Gly Arg Tyr Lys Cys Pro Phe Ala Cys Tyr Arg Leu Gly
165 170 175

25 Ser Ile Tyr Glu Val Gly Lys Glu Gly Ser Pro Asp Ile Tyr Glu Arg
180 185 190

30 Gly Asp Glu Val Ser Val Thr Phe Asp Tyr Ala Leu Glu Asp Phe Leu
195 200 205

35 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
225 230 235 240

40 Ala Thr Ala Met Gln Ser Asp Asp Phe Val Leu Ser Gly Arg Tyr Gly
245 250 255

45 Val Arg Lys Val Lys Phe Pro Gly Ala Phe Gly Ser Ile Lys Tyr Leu
260 265 270

50 Leu Asn Ile Gln Gly Asp Ala Trp Leu Asp Leu Ser Glu Val Thr Ala
275 280 285

RU 2476595 C2

Tyr Arg Ser Tyr Gly Met Val Ile Gly Phe Trp Thr Asp Ser Lys Ser
290 295 300

5 Pro Gln Leu Pro Thr Asp Phe Thr Gln Phe Asn Ser Ala Asn Cys Pro
305 310 315 320

10 Val Gln Thr Val Ile Ile Ile Pro Ser
325

15 <210> 17
<211> 130
<212> БЕЛОК
<213> бактериофаг MS2

20 <400> 17

Met Ala Ser Asn Phe Thr Gln Phe Val Leu Val Asp Asn Gly Gly Thr
1 5 10 15

25 Gly Asp Val Thr Val Ala Pro Ser Asn Phe Ala Asn Gly Val Ala Glu
20 25 30

30 Trp Ile Ser Ser Asn Ser Arg Ser Gln Ala Tyr Lys Val Thr Cys Ser
35 40 45

35 Val Arg Gln Ser Ser Ala Gln Asn Arg Lys Tyr Thr Ile Lys Val Glu
50 55 60

40 Val Pro Lys Val Ala Thr Gln Thr Val Gly Gly Val Glu Leu Pro Val
65 70 75 80

45 Ala Ala Trp Arg Ser Tyr Leu Asn Met Glu Leu Thr Ile Pro Ile Phe
85 90 95

Ala Thr Asn Ser Asp Cys Glu Leu Ile Val Lys Ala Met Gln Gly Leu

50

	100	105	110
5	Leu Lys Asp Gly Asn Pro Ile Pro Ser Ala Ile Ala Ala Asn Ser Gly		
	115	120	125
10	Ile Tyr		
	130		
15	<210> 18		
	<211> 133		
	<212> БЕЛОК		
	<213> бактериофаг M11		
20	<400> 18		
	Met Ala Lys Leu Gln Ala Ile Thr Leu Ser Gly Ile Gly Lys Lys Gly		
	1 5 10 15		
25	Asp Val Thr Leu Asp Leu Asn Pro Arg Gly Val Asn Pro Thr Asn Gly		
	20 25 30		
30	Val Ala Ala Leu Ser Glu Ala Gly Ala Val Pro Ala Leu Glu Lys Arg		
	35 40 45		
35	Val Thr Ile Ser Val Ser Gln Pro Ser Arg Asn Arg Lys Asn Tyr Lys		
	50 55 60		
40	Val Gln Val Lys Ile Gln Asn Pro Thr Ser Cys Thr Ala Ser Gly Thr		
	65 70 75 80		
45	Cys Asp Pro Ser Val Thr Arg Ser Ala Tyr Ser Asp Val Thr Phe Ser		
	85 90 95		
50	Phe Thr Gln Tyr Ser Thr Val Glu Glu Arg Ala Leu Val Arg Thr Glu		
	100 105 110		

Leu Gln Ala Leu Leu Ala Asp Pro Met Leu Val Asn Ala Ile Asp Asn

115

120

125

5

Leu Asn Pro Ala Tyr

130

10

<210> 19

<211> 133

<212> БЕЛОК

<213> бактериофаг МХ1

15

<400> 19

Met Ala Lys Leu Gln Ala Ile Thr Leu Ser Gly Ile Gly Lys Asn Gly

1

5

10

15

20

Asp Val Thr Leu Asn Leu Asn Pro Arg Gly Val Asn Pro Thr Asn Gly

20

25

30

25

Val Ala Ala Leu Ser Glu Ala Gly Ala Val Pro Ala Leu Glu Lys Arg

35

40

45

30

Val Thr Ile 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 Ser Cys Thr Ala Ser Gly Thr

65

70

75

80

40

Cys Asp Pro Ser Val Thr Arg Ser Ala Tyr Ala Asp Val Thr Phe Ser

85

90

95

45

Phe Thr Gln Tyr Ser Thr Asp Glu Glu Arg Ala Leu Val Arg Thr Glu

100

105

110

Leu Lys Ala Leu Leu Ala Asp Pro Met Leu Ile Asp Ala Ile Asp Asn

115

120

125

50

Leu Asn Pro Ala Tyr

130

5

<210> 20

<211> 330

<212> БЕЛОК

<213> бактериофаг NL95

10

<400> 20

Met Ala Lys Leu Asn Lys Val Thr Leu Thr Gly Ile Gly Lys Ala Gly

1

5

10

15

15

Asn Gln Thr Leu Thr Leu Thr Pro Arg Gly Val Asn Pro Thr Asn Gly

20

25

30

20

Val Ala Ser Leu Ser Glu Ala Gly Ala Val Pro Ala Leu Glu Lys Arg

35

40

45

25

Val Thr Val Ser Val Ala Gln Pro Ser Arg Asn Arg Lys Asn Tyr Lys

50

55

60

30

Val Gln Ile Lys Leu Gln Asn Pro Thr Ala Cys Thr Lys Asp Ala Cys

65

70

75

80

35

Asp Pro Ser Val Thr Arg Ser Gly Ser Arg Asp Val Thr Leu Ser Phe

85

90

95

40

Thr Ser Tyr Ser Thr Glu Arg Glu Arg Ala Leu Ile Arg Thr Glu Leu

100

105

110

45

Ala Ala Leu Leu Lys Asp Asp Leu Ile Val Asp Ala Ile Asp Asn Leu

115

120

125

Asn Pro Ala Tyr Trp Ala Ala Leu Leu Ala Ala Ser Pro Gly Gly Gly

130

135

140

50

RU 2476595 C2

Asn Asn Pro Tyr Pro Gly Val Pro Asp Ser Pro Asn Val Lys Pro Pro
145 150 155 160

5 Gly Gly Thr Gly Thr Tyr Arg Cys Pro Phe Ala Cys Tyr Arg Arg Gly
165 170 175

10 Glu Leu Ile Thr Glu Ala Lys Asp Gly Ala Cys Ala Leu Tyr Ala Cys
180 185 190

15 Gly Ser Glu Ala Leu Val Glu Phe Glu Tyr Ala Leu Glu Asp Phe Leu
195 200 205

20 Gly Asn Glu Phe Trp Arg Asn Trp Asp Gly Arg Leu Ser Lys Tyr Asp
210 215 220

25 Ile Glu Thr His Arg Arg Cys Arg Gly Asn Gly Tyr Val Asp Leu Asp
225 230 235 240

30 Ala Ser Val Met Gln Ser Asp Glu Tyr Val Leu Ser Gly Ala Tyr Asp
245 250 255

35 Val Val Lys Met Gln Pro Pro Gly Thr Phe Asp Ser Pro Arg Tyr Tyr
260 265 270

Leu His Leu Met Asp Gly Ile Tyr Val Asp Leu Ala Glu Val Thr Ala
275 280 285

40 Tyr Arg Ser Tyr Gly Met Val Ile Gly Phe Trp Thr Asp Ser Lys Ser
290 295 300

45 Pro Gln Leu Pro Thr Asp Phe Thr Arg Phe Asn Arg His Asn Cys Pro
305 310 315 320

50

Val Gln Thr Val Ile Val Ile Pro Ser Leu

325

330

5

<210> 21

<211> 129

<212> БЕЛОК

<213> бактериофаг f2

10

<400> 21

Ala Ser Asn Phe Thr Gln Phe Val Leu Val Asn Asp Gly Gly Thr Gly

1

5

10

15

15

Asn Val Thr Val Ala Pro Ser Asn Phe Ala Asn Gly Val Ala Glu Trp

20

25

30

20

Ile Ser Ser Asn Ser Arg Ser Gln Ala Tyr Lys Val Thr Cys Ser Val

35

40

45

25

Arg Gln Ser Ser Ala Gln Asn Arg Lys Tyr Thr Ile Lys Val Glu Val

50

55

60

30

Pro Lys Val Ala Thr Gln Thr Val Gly Gly Val Glu Leu Pro Val Ala

65

70

75

80

35

Ala Trp Arg Ser Tyr Leu Asn Leu Glu Leu Thr Ile Pro Ile Phe Ala

85

90

95

40

Thr Asn Ser Asp Cys Glu Leu Ile Val Lys Ala Met Gln Gly Leu Leu

100

105

110

45

Lys Asp Gly Asn Pro Ile Pro Ser Ala Ile Ala Ala Asn Ser Gly Ile

115

120

125

Tyr

50

<210> 22
 <211> 128
 <212> БЕЛОК
 <213> бактериофаг PP7

5

<400> 22

10

Met Ser Lys Thr Ile Val Leu Ser Val Gly Glu Ala Thr Arg Thr Leu
 1 5 10 15

15

Thr Glu Ile Gln Ser Thr Ala Asp Arg Gln Ile Phe Glu Glu Lys Val
 20 25 30

20

Gly Pro Leu Val Gly Arg Leu Arg Leu Thr Ala Ser Leu Arg Gln Asn
 35 40 45

25

Gly Ala Lys Thr Ala Tyr Arg Val Asn Leu Lys Leu Asp Gln Ala Asp
 50 55 60

30

Val Val Asp Cys Ser Thr Ser Val Cys Gly Glu Leu Pro Lys Val Arg
 65 70 75 80

35

Tyr Thr Gln Val Trp Ser His Asp Val Thr Ile Val Ala Asn Ser Thr
 85 90 95

40

Glu Ala Ser Arg Lys Ser Leu Tyr Asp Leu Thr Lys Ser Leu Val Ala
 100 105 110

Thr Ser Gln Val Glu Asp Leu Val Val Asn Leu Val Pro Leu Gly Arg
 115 120 125

45

<210> 23
 <211> 131
 <212> БЕЛОК
 <213> бактериофаг AP205

50

<400> 23

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

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
85 90 95

Trp Glu Thr His Lys Arg Asn Val Asp Thr Leu Phe Ala Ser Gly Asn
100 105 110

Ala Gly Leu Gly Phe Leu Asp Pro Thr Ala Ala Ile Val Ser Ser Asp
115 120 125

Thr Thr Ala
130

Формула изобретения

1. Способ получения нуклеотидной композиции, содержащей олигонуклеотид, который включает следующие стадии:

(а) обеспечения олигонуклеотида в растворе I, причем указанный олигонуклеотид содержит по меньшей мере один участок поли-G, причем указанный раствор I имеет щелочной рН, причем предпочтительно величина указанного рН равна 8-13, более предпочтительно величина указанного рН равна 12,

(б) дезагрегации указанного олигонуклеотида, причем указанная дезагрегация включает стадии:

(i) регуляции температуры раствора I до температуры I, причем указанная температура I составляет 4-70°C, предпочтительно 45-70°C, более предпочтительно примерно 50°C, и наиболее предпочтительно 50°C,

(ii) инкубирования указанного олигонуклеотида в указанном растворе I при

указанной температуре I, причем указанное инкубирование проводят до тех пор, пока указанный олигонуклеотид характеризуется относительным временем начала выхода пика примерно 110% в гель хроматографии с использованием капсида бактериофага Q ν в качестве стандарта, и

(iii) регуляции температуры указанного раствора I до температуры II, причем указанная температура II составляет 0-70°C, причем предпочтительно указанная температура II ниже температуры I, и также предпочтительно температура II составляет 0-25°C, наиболее предпочтительно 0-2°C,

(в) регуляции рН указанного раствора I до величины 5-8, причем предпочтительно указанную регуляцию указанной величины рН указанного раствора I проводят до тех пор, пока указанный рН составляет величину 6-7, и

(г) агрегирования указанного олигонуклеотида, причем указанное агрегирование включает стадии:

(i) обеспечения указанного олигонуклеотида в растворе II, причем величина рН указанного раствора II составляет 5-8 и указанный раствор содержит по меньшей мере 20 мМ катиона, причем указанный катион выбран из группы, состоящей из Na⁺, K⁺, NH₄⁺, Li⁺, Ca²⁺ и Mg²⁺, причем предпочтительно указанный раствор II содержит 200-275 мМ указанного катиона, предпочтительно 250 мМ,

(ii) регуляции температуры раствора II до температуры III, причем указанная температура III составляет 50-99°C, предпочтительно 80-90°C, более предпочтительно примерно 85°C, и наиболее предпочтительно 85°C, (iii)

инкубирования указанного олигонуклеотида в растворе II при температуре III, причем указанное инкубирование проводят до тех пор, пока указанный олигонуклеотид характеризуется относительным временем начала выхода пика 50-110% в гель хроматографии с использованием капсида бактериофага Q ν в качестве стандарта, и

(iv) регуляции температуры раствора II до температуры IV, причем указанная температура IV ниже 50°C, причем предпочтительно указанная температура IV составляет 0-25°C, более предпочтительно 0-2°C.

2. Способ по п.1, в котором указанную регуляцию температуры указанного раствор I до температуры II проводят со скоростью изменения температуры по меньшей мере 3,6°C/мин.

3. Способ по п.1, в котором указанную регуляцию температуры раствора II до температуры IV проводят со скоростью изменения температуры по меньшей мере 3,6°C/мин.

4. Способ по п.1, в котором указанный раствор I включает гидроксид щелочного металла, предпочтительно гидроксида калия или гидроксида натрия, наиболее предпочтительно гидроксида натрия, причем концентрация указанного гидрохлорида составляет 10-200 мМ, предпочтительно примерно 25 мМ, наиболее предпочтительно 25 мМ.

5. Способ по п.1, в котором указанную регуляцию рН указанного раствора I осуществляют добавлением кислоты в указанный раствор I, причем предпочтительно указанная кислота является фосфорной кислотой.

6. Способ по п.1, в котором указанный катион является Na⁺ или K⁺, причем предпочтительно указанный катион является Na⁺.

7. Способ по п.1, в котором концентрация указанного олигонуклеотида в указанном растворе I составляет от 50 мкМ до 2 мМ, наиболее предпочтительно 260 мкМ.

8. Способ по п.1, в котором концентрация указанного олигонуклеотида в указанном растворе II составляет от 50 мкМ до 2 мМ, предпочтительно 100-300 мкМ, наиболее предпочтительно 175 мкМ.

9. Способ по п.1, в котором указанное инкубирование указанного олигонуклеотида в растворе II при температуре III проводят до тех пор, пока указанный олигонуклеотид характеризуется относительным временем начала выхода пика 80-95%, предпочтительно 80-90%, еще более предпочтительно 83-90%, еще более предпочтительно 85-90%, и наиболее предпочтительно 88% в гель хроматографии с использованием капсида бактериофага Qв в качестве стандарта.

10. Способ по п.1, в котором указанный олигонуклеотид содержит с 5'-конца по меньшей мере 3 и не более 15 единиц гуанозина, и с 3'-конца по меньшей мере 3 и не более 15 единиц гуанозина, причем предпочтительно указанный олигонуклеотид содержит палиндромную последовательность, также предпочтительно указанной палиндромной последовательностью является последовательность GACGATCGTC (SEQ ID NO:1).

11. Способ по п.1, в котором указанный олигонуклеотид имеет последовательность нуклеиновой кислоты, выбранную из группы, состоящей из:

- (а) «G4-4» GGGGGACGATCGTCGGGG (SEQ ID NO:2);
- (б) «G5-5» GGGGGGACGATCGTCGGGGG (SEQ ID NO:3);
- (в) «G6-6» GGGGGGGACGATCGTCGGGGGG (SEQ ID NO:4);
- (г) «G7-7» GGGGGGGGACGATCGTCGGGGGGG (SEQ ID NO:5);
- (д) «G8-8» GGGGGGGGGACGATCGTCGGGGGGGG (SEQ ID NO:6);
- (е) «G9-9» GGGGGGGGGGACGATCGTCGGGGGGGGG (SEQ ID NO:7);
- (ж) «G10» GGGGGGGGGGGACGATCGTCGGGGGGGGGG (SEQ ID NO:8);
- (з) «G11» GGGGGGGGGGGGACGATCGTCGGGGGGGGGGG (SEQ ID NO:9).

12. Способ по одному из предшествующих пунктов, в котором указанный олигонуклеотид имеет последовательность нуклеиновой кислоты «G8-8» GGGGGGGGGGACGATCGTCGGGGGGGGG (SEQ ID NO:6).

13. Способ по п.1, в котором указанный олигонуклеотид имеет последовательность нуклеиновой кислоты «G10» GGGGGGGGGGGACGATCGTCGGGGGGGGGG (SEQ ID NO:8).

14. Нуклеотидная композиция для упаковки в вирусоподобную частицу РНК бактериофага, включающая олигонуклеотид, причем указанная композиция может быть получена способом по одному из пп.1-13, причем предпочтительно указанный олигонуклеотид характеризуется относительным временем начала выхода пика 50-110%, предпочтительно 80-95%, более предпочтительно 80-90%, еще более предпочтительно 83-90%, еще более предпочтительно 85-90%, и наиболее предпочтительно 88% в гель хроматографии с использованием капсида бактериофага Qв в качестве стандарта.

15. Нуклеотидная композиция по п.14, в которой указанный олигонуклеотид имеет последовательность нуклеиновой кислоты «G8-8» GGGGGGGGGGACGATCGTCGGGGGGGGG (SEQ ID NO:6) или «G10» GGGGGGGGGGGACGATCGTCGGGGGGGGGG (SEQ ID NO:8), причем предпочтительно указанный олигонуклеотид имеет последовательность нуклеиновой кислоты «G10» GGGGGGGGGGGGACGATCGTCGGGGGGGGGGG (SEQ ID NO:8).

16. Способ получения композиции, включающей (i) вирусоподобную частицу, которая является вирусоподобной частицей РНК-содержащего бактериофага, и (ii) олигонуклеотид, причем указанный олигонуклеотид упакован в указанную

вирусоподобную частицу, включающий стадии:

(а) обеспечения белка оболочки указанного РНК-содержащего бактериофага,

(б) обеспечения олигонуклеотида,

5 (i) причем указанный олигонуклеотид включает по меньшей мере один отрезок поли-G, и

(ii) причем указанный олигонуклеотид характеризуется относительным временем выхода пика 50-110% в гель хроматографии с использованием капсида бактериофага Q β в качестве стандарта,

10 (в) получения смеси, причем указанная смесь включает:

(i) указанный белок оболочки, причем предпочтительно концентрация указанного белка оболочки в указанной смеси составляет 1-4 мг/мл, более предпочтительно 2,5 мг/мл, и/или также предпочтительно концентрация указанного олигонуклеотида в

15 (ii) агент, способный предупреждать самосборку указанного белка оболочки, причем предпочтительно указанный агент является денатурирующим соединением, выбранным из мочевины и гуанидиния гидрохлорида, также предпочтительно указанное денатурирующее соединение является мочевиной, и также

20 предпочтительно концентрация указанной мочевины в указанной смеси составляет 0,25-7,2 М, предпочтительно 1 М,

(iii) указанный олигонуклеотид,

(г) удаления указанного агента из указанной смеси, и

25 (д) допущения самосборки указанного белка оболочки в вирусоподобную частицу.

17. Способ по п.16, в котором указанный белок оболочки включает, или, в другом варианте, в значительной степени состоит из рекомбинантных белков или их фрагментов РНК-содержащего бактериофага, причем предпочтительно указанный бактериофаг выбран из группы, состоящей из:

30 (а) бактериофага Q β ,

(б) бактериофага R17,

(в) бактериофага fr,

(г) бактериофага GA,

35 (д) бактериофага SP,

(е) бактериофага MS2,

(ж) бактериофага M11,

(з) бактериофага MX1,

(и) бактериофага NL95,

40 (к) бактериофага f2,

(л) бактериофага PP7 и

(м) бактериофага AP205.

18. Способ по п.16, в котором указанным РНК-содержащим бактериофагом является бактериофаг Q β .

45 19. Способ по п.16, в котором указанный белок оболочки включает или предпочтительно состоит из последовательности, выбранной из группы, состоящей из:

(а) SEQ ID NO:10 (Q β CP),

50 (б) смесь SEQ ID NO:10 и SEQ ID NO:11 (Q β A1 белок),

(в) SEQ ID NO:12 (белок оболочки R17),

(г) SEQ ID NO:13 (белок оболочки fr),

(д) SEQ ID NO:14 (белок оболочки GA),

- (е) SEQ ID NO:15 (белок оболочки SP),
 (ж) смесь SEQ ID NO:15 и SEQ ID NO:16,
 (з) SEQ ID NO:17 (белок оболочки MS2),
 (и) SEQ ID NO:18 (белок оболочки M11),
 (к) SEQ ID NO:19 (белок оболочки MX1),
 (л) SEQ ID NO:20 (белок оболочки NL95),
 (м) SEQ ID NO:21 (белок оболочки f2),
 (н) SEQ ID NO:22 (белок оболочки PP7) и
 (о) SEQ ID NO:23 (белок оболочки AP205).

20. Способ по п.16, в котором мольное соотношение указанного олигонуклеотида и указанного белка оболочки в указанной смеси составляет 0,5-1,2, предпочтительно 0,7.

21. Способ по п.16, в котором указанный агент также является окислительным агентом, причем предпочтительно указанным окислительным агентом является дитиозеритол (ДТЭ), и также предпочтительно концентрация указанного ДТЭ в указанной смеси составляет 1-25 мМ, более предпочтительно 2,5 мМ.

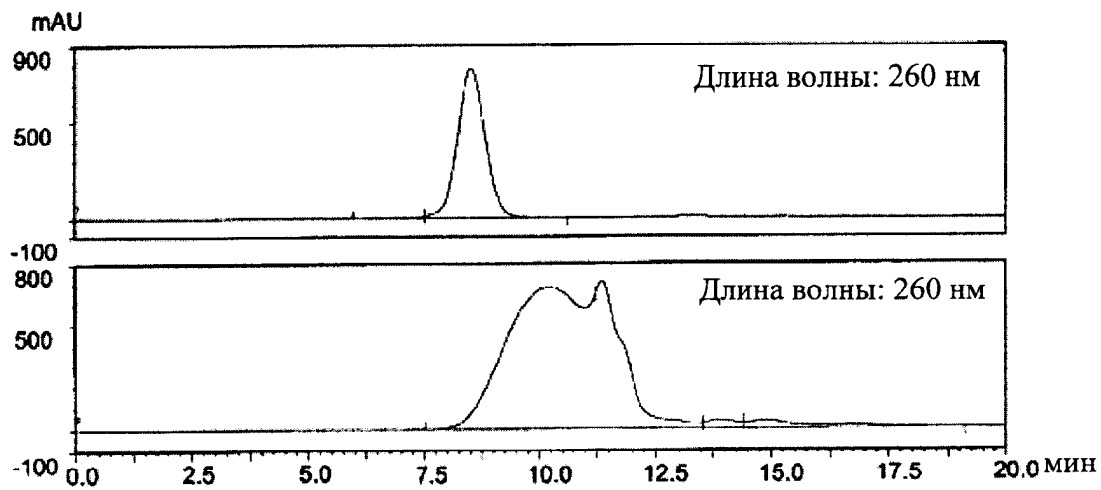
22. Способ по п.16, в котором указанное удаление указанного агента из указанной смеси осуществляют первой заменой буфера на первый буфер, причем указанный первый буфер включает натрий хлорид, причем предпочтительно концентрация указанного натрия хлорида в указанном первом буфере составляет 0-1 М, предпочтительно 0-550 мМ, более предпочтительно 0-350 мМ, еще более предпочтительно 50-350 мМ, и наиболее предпочтительно 250 мМ.

23. Способ по п.16, в котором указанный способ дополнительно включает стадию контакта указанной вирусоподобной частицы с окисляющим агентом, причем предпочтительно указанный окисляющий агент выбран из группы, включающей:

- (а) перекись водорода, причем предпочтительно концентрация указанной перекиси водорода составляет 0,25-50 мМ, предпочтительно 2 мМ,
 (б) кислород,
 (в) глутатион,
 (г) Cu^{2+} и
 (д) Fe^{3+} .

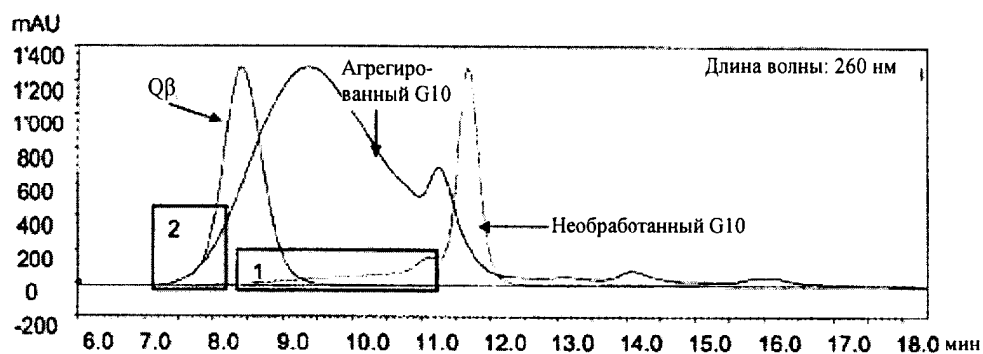
24. Способ по п.16, причем указанный способ дополнительно включает стадию очистки указанной вирусоподобной частицы, и в котором предпочтительно указанная очистка включает вторую замену буфера на второй буфер, причем указанный второй буфер является фармацевтически приемлемым буфером.

25. Способ по п.16, в котором выход белка составляет по меньшей мере 75%, и/или в котором выход олигонуклеотида составляет по меньшей мере 75%.

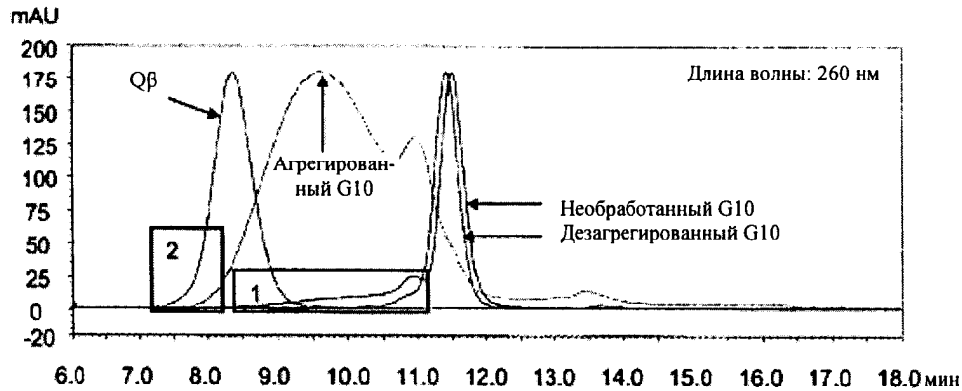


Фиг. 1

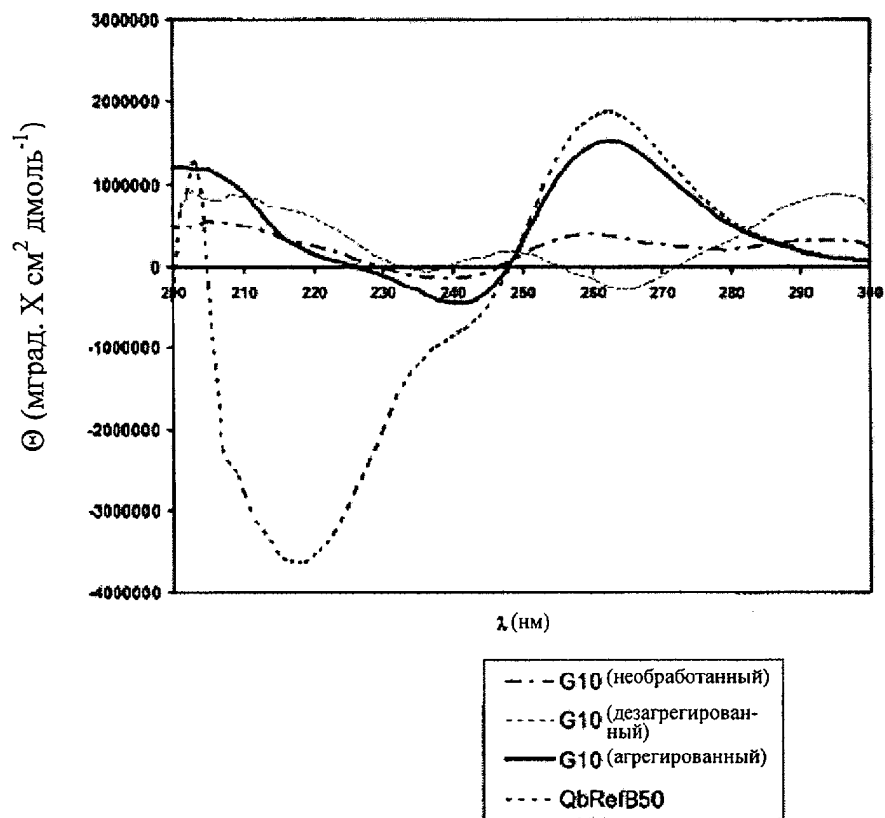
А



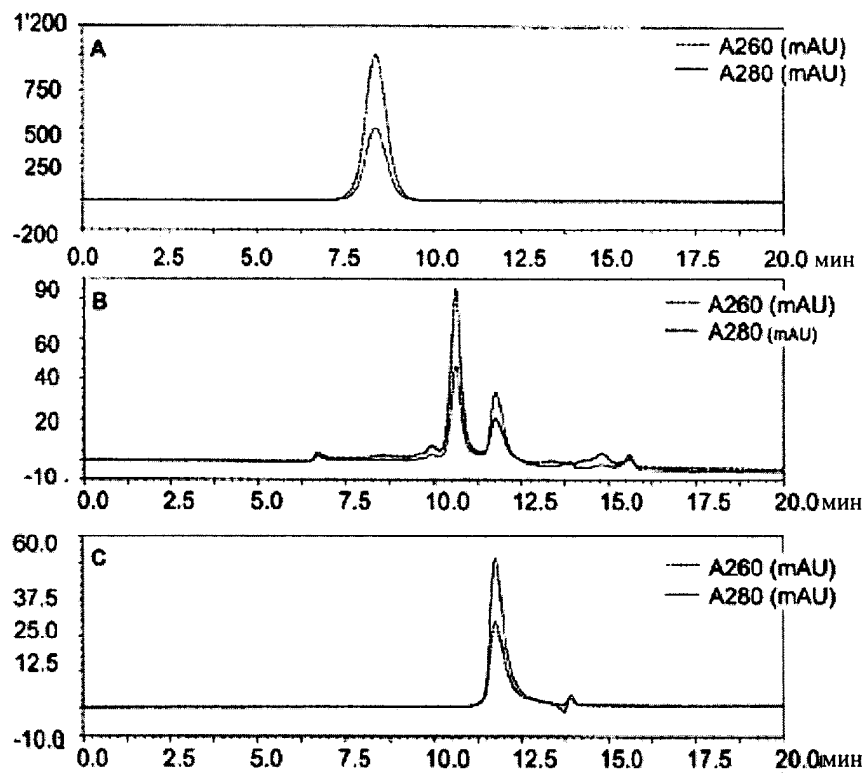
Б



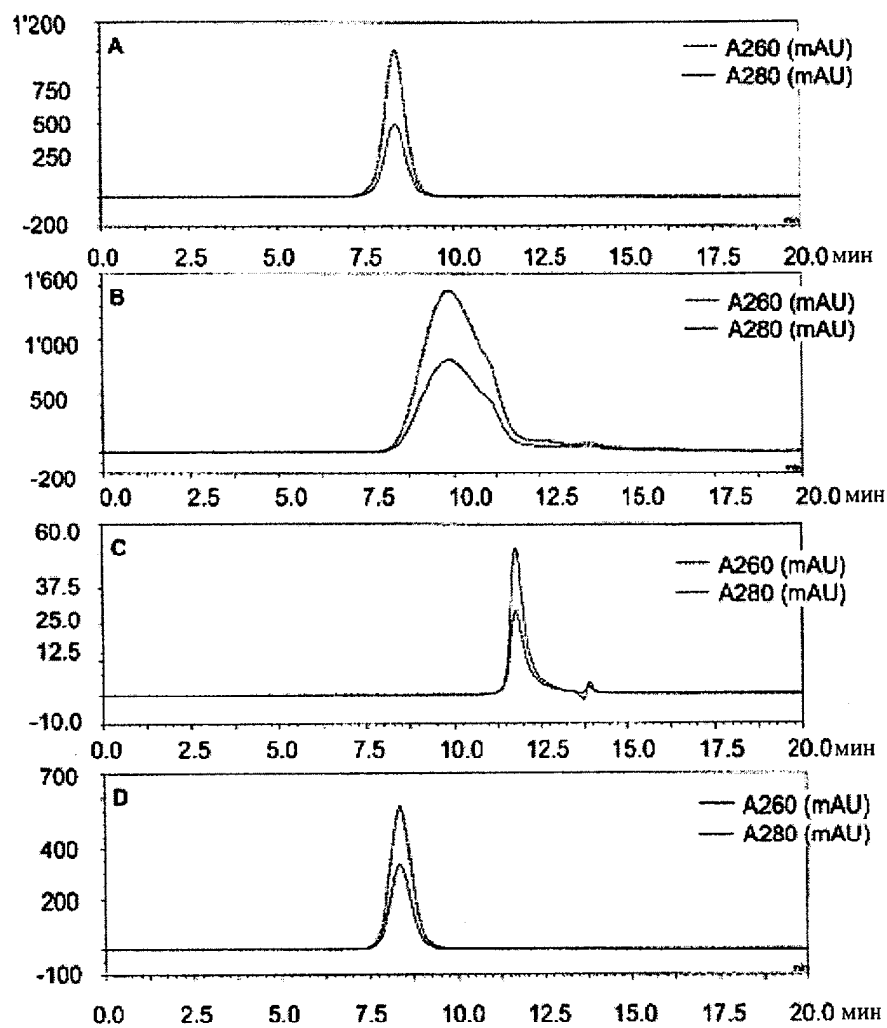
Фиг. 2



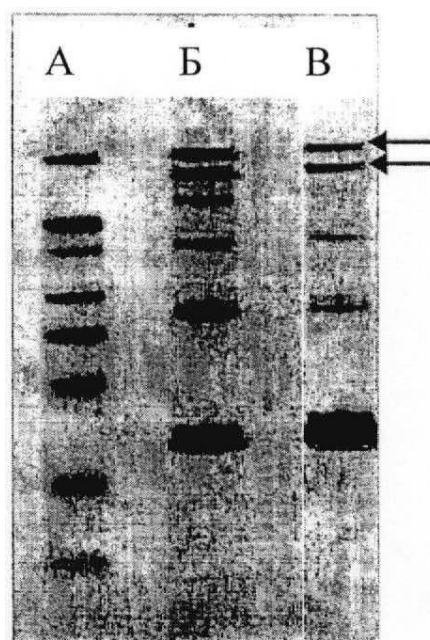
Фиг. 3



Фиг. 4



Фиг. 5



Фиг. 6