

(11) Número de Publicação: **PT 2032592 E**

(51) Classificação Internacional:

**C12N 15/117** (2013.01) **C07H 21/00** (2013.01)  
**C12N 7/04** (2013.01) **C12N 15/11** (2013.01)

**(12) FASCÍCULO DE PATENTE DE INVENÇÃO**

(22) Data de pedido: **2007.06.12**

(30) Prioridade(s): **2006.06.12 US 812592 P**  
**2006.12.14 WO**

**PCT/EP2006/069734**

(43) Data de publicação do pedido: **2009.03.11**

(45) Data e BPI da concessão: **2013.07.31**  
**163/2013**

(73) Titular(es):

**CYTOS BIOTECHNOLOGY AG**  
**WAGISTRASSE 25 8952 ZÜRICH-SCHLIERENCH**

(72) Inventor(es):

**MATTHIAS KINZLER**  
**KARL PROBA**

**CH**  
**CH**

(74) Mandatário:

**ANTÓNIO INFANTE DA CÂMARA TRIGUEIROS DE ARAGÃO**  
**RUA DO PATROCÍNIO, Nº 94 1399-019 LISBOA**

**PT**

(54) Epígrafe: **PROCESSOS PARA O EMPACOTAMENTO DE OLIGONUCLEÓTIDOS EM PARTÍCULAS SEMELHANTES A VÍRUS DE BACTERIÓFAGOS DE ARN**

(57) Resumo:

INVENÇÃO PROPORCIONA PROCESSOS PARA A PRODUÇÃO DE COMPOSIÇÕES COMPREENDENDO (I) UMA PARTÍCULA SEMELHANTE A VÍRUS, EM QUE A REFERIDA PARTÍCULA SEMELHANTE A VÍRUS É UMA PARTÍCUL SEMELHANTE A VÍRUS DE UM BACTERIÓFAGO DE ARN E (II) UM OLIGONUCLEÓTIDO, EM QUE O REFERIDO OLIGONUCLEÓTIDO ESTÁ EMPACOTADO NA REFERIDA PARTÍCULA SEMELHANTE A VÍRUS. A INVENÇÃO PROPORCIONA, AINDA, PROCESSOS PARA A PRODUÇÃO DE COMPOSIÇÕES NUCLEOTÍDICAS COMPREENDENDO OLIGONUCLEÓTIDOS ADEQUADOS PARA SEREM UTILIZADOS NOS PROCESSOS ACIMA MENCIONADOS. A INVENÇÃO PROPORCIONA, AINDA, COMPOSIÇÕES NUCLEOTÍDICAS OBTENÍVEIS PELOS PROCESSOS DA INVENÇÃO E AS SUAS UTILIZAÇÕES. A INVENÇÃO PROPORCIONA, AINDA, COMPOSIÇÕES COMPREENDENDO (I) UMA PARTÍCULA SEMELHANTE A VÍRUS, EM QUE A REFERIDA PARTÍCULA SEMELHANTE A VÍRUS É UMA PARTÍCULA SEMELHANTE A VÍRUS DE UM BACTERIÓFAGO DE ARN E (II) UM OLIGONUCLEÓTIDO, EM QUE O REFERIDO OLIGONUCLEÓTIDO ESTÁ EMPACOTADO NA REFERIDA PARTÍCULA SEMELHANTE A VÍRUS, EM QUE AS REFERIDAS COMPOSIÇÕES SÃO OBTENÍVEIS PELOS PROCESSOS DA INVENÇÃO E EM QUE AS REFERIDAS COMPOSIÇÕES COMPREENDEM, DE UM MODO PREFERIDO, UMA PUREZA DE, PELO MENOS, 98%, DE UM MODO MUITO PREFERIDO, DE, PELO MENOS, 99%.

## **RESUMO**

### **"PROCESSOS PARA O EMPACOTAMENTO DE OLIGONUCLEÓTIDOS EM PARTÍCULAS SEMELHANTES A VÍRUS DE BACTERIÓFAGOS DE ARN"**

A invenção proporciona processos para a produção de composições compreendendo (i) uma partícula semelhante a vírus, em que a referida partícula semelhante a vírus é uma partícula semelhante a vírus de um bacteriófago de ARN e (ii) um oligonucleotídeo, em que o referido oligonucleotídeo está empacotado na referida partícula semelhante a vírus. A invenção proporciona, ainda, processos para a produção de composições nucleotídicas compreendendo oligonucleotídeos adequados para serem utilizados nos processos acima mencionados. A invenção proporciona, ainda, composições nucleotídicas obteníveis pelos processos da invenção e as suas utilizações. A invenção proporciona, ainda, composições compreendendo (i) uma partícula semelhante a vírus, em que a referida partícula semelhante a vírus é uma partícula semelhante a vírus de um bacteriófago de ARN e (ii) um oligonucleotídeo, em que o referido oligonucleotídeo está empacotado na referida partícula semelhante a vírus, em que as referidas composições são obteníveis pelos processos da invenção e em que as referidas composições compreendem, de um modo preferido, uma pureza de, pelo menos, 98%, de um modo muito preferido, de, pelo menos, 99%.

## **DESCRIÇÃO**

### **"PROCESSOS PARA O EMPACOTAMENTO DE OLIGONUCLEÓTIDOS EM PARTÍCULAS SEMELHANTES A VÍRUS DE BACTERIÓFAGOS DE ARN"**

#### **CAMPO DA INVENÇÃO**

A invenção proporciona processos para a produção de composições compreendendo (i) uma partícula semelhante a vírus, em que a referida partícula semelhante a vírus é uma partícula semelhante a vírus de um bacteriófago de ARN e (ii) um oligonucleotídeo, em que o referido oligonucleotídeo está empacotado na referida partícula semelhante a vírus. A invenção proporciona, ainda, processos para a produção de composições nucleotídicas compreendendo oligonucleotídeos adequados para serem utilizados nos processos mencionados antes. A divulgação proporciona, ainda, composições nucleotídicas obteníveis pelos processos da invenção e as suas utilizações. A divulgação proporciona, ainda, composições compreendendo (i) uma partícula semelhante a vírus, em que a referida partícula semelhante a vírus é uma partícula semelhante a vírus de um bacteriófago de ARN e (ii) um oligonucleotídeo, em que o referido oligonucleotídeo está empacotado na referida partícula semelhante a vírus, em que as referidas composições são obteníveis pelos processos da invenção e em que as referidas composições compreendem, de um modo preferido, uma pureza de, pelo menos, 98%, de um modo muito preferido, de, pelo menos, 99%.

## **TÉCNICA RELACIONADA**

As partículas semelhantes a vírus de bacteriófagos de ARN empacotadas com oligonucleótidos são potentes estimuladores do sistema imunitário (documento WO2003/024481A2) e são largamente utilizadas em modernos tratamentos de vacinação. Os processos para a produção de composições compreendendo (i) uma partícula semelhante a vírus, em que a referida partícula semelhante a vírus é uma partícula semelhante a vírus de um bacteriófago de ARN e (ii) um oligonucleótido, em que o referido oligonucleótido está empacotado na referida partícula semelhante a vírus foram descritos, por exemplo, nos documentos WO2003/024481A2, WO2004/000351A1, WO2004/084940A1 e WO2004/007538A2. São mais geralmente utilizados os processos que são baseados no desagrupamento de uma partícula semelhante a vírus recombinante, na purificação da proteína de revestimento e no reagrupamento da referida proteína de revestimento na presença de ácido nucleico. Os processos eficientes e susceptíveis de aumento de escala para a produção de uma partícula semelhante a vírus recombinante de bacteriófagos de ARN são divulgados no documento WO2005/117963A1. Os processos para a purificação em grande escala de partículas semelhantes a vírus isentas de endotoxina, intactas, são divulgados no documento WO2007/039552A1. Os processos para a preparação de proteína de revestimento a partir de partículas semelhantes a vírus produzidas de modo recombinante (“desagrupamento”) são divulgados, *inter alia*, no documento WO2003/024481A2 e na secção de exemplos do presente pedido. Os processos para o agrupamento de proteína de revestimento na presença de ácido nucleico (“reagrupamento”) divulgados na técnica anterior não estão optimizados em relação à eficiência, possibilidade de aumento de escala e pureza do produto agrupado. Em particular, a técnica

anterior não ensina que a eficiência do processo de “reagrupamento” pode ser dramaticamente melhorada pela utilização de oligonucleótido agregado compreendendo um determinado tamanho de partícula (aqui caracterizado pelo tempo de início do pico relativo, ver abaixo). Este pedido proporciona um processo de “reagrupamento” com eficiência dramaticamente melhorada, conduzindo a um produto de empacotamento de pureza muito elevada. Tipicamente e, de um modo preferido, o processo de “reagrupamento” aqui divulgado compreende um rendimento de proteína e um rendimento de oligonucleótido de, pelo menos, cerca de 75% e resulta num produto (composição compreendendo uma partícula semelhante a vírus empacotada com oligonucleótido) que tipicamente e de um modo preferido, é, pelo menos, 99% pura.

## **SUMÁRIO DA INVENÇÃO**

O âmbito da presente invenção é definido pelas reivindicações e qualquer informação que não esteja abrangida pelas reivindicações é proporcionada apenas para informação.

A invenção refere-se a um processo para a produção de uma composição nucleotídica compreendendo (i) uma partícula semelhante a vírus, em que a referida partícula semelhante a vírus é uma partícula semelhante a vírus de um bacteriófago de ARN e (ii) um oligonucleótido, em que o referido oligonucleótido está empacotado na referida partícula semelhante a vírus. Durante o referido processo, a referida partícula semelhante a vírus é formada por auto-agrupamento de proteína de revestimento do referido bacteriófago de ARN, na presença de um oligonucleótido. Foi, surpreendentemente, verificado que a eficiência do processo pode ser significativamente melhorada

quando o auto-agrupamento da proteína de revestimento é realizado na presença de oligonucleótido agregado. Em geral, os oligonucleótidos compreendendo, pelo menos, uma extensão de poli G são capazes de agregação. O estado de agregação de um oligonucleótido pode ser caracterizado pelo tempo de início do pico relativo em HPLC de exclusão de tamanho, utilizando a cápside do referido bacteriófago de ARN como padrão. Verificou-se que o oligonucleótido compreendendo um tempo de início do pico relativo de 50 a 110%, de um modo preferido, de 80 a 95%, era óptimo. Isto corresponde a agregados oligonucleotídicos compreendendo um peso molecular aparente que está na gama ou é ligeiramente inferior, do peso molecular aparente da cápside do referido bacteriófago de ARN. Verificou-se que o oligonucleótido compreendendo o tempo de início do pico relativo desejado pode ser obtido pela submissão do referido oligonucleótido a um processo de agregação.

Deste modo, um primeiro aspecto da invenção é um processo para a produção de uma composição nucleotídica compreendendo um oligonucleótido, em que o referido oligonucleótido compreende um tempo de início do pico relativo de 50 a 110%, o referido processo compreendendo as etapas de: (a) proporcionar um oligonucleótido numa solução II, em que o referido oligonucleótido tem, pelo menos, uma extensão de poli G; e em que a referida solução II compreende um pH de 5 a 8; e em que a referida solução II compreende um catião, em que, de um modo preferido, a concentração do referido catião na referida solução II é, pelo menos, 20 mM, em que o referido catião é, de um modo preferido, seleccionado do grupo consistindo de  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ ,  $\text{NH}_4^+$ ,  $\text{Li}^+$ ,  $\text{Ca}^{2+}$  e  $\text{Mg}^{2+}$ ; (b) ajustamento da temperatura da solução II à temperatura III, em que a referida temperatura III é 50 a 99 °C; e (c) incubação do referido oligonucleótido na

solução II à temperatura III, em que a referida incubação é realizada até que o referido oligonucleótido comporte um tempo de início do pico relativo de 50 a 110%; e e (d) ajustamento da temperatura da solução II à temperatura IV, em que a referida temperatura IV é inferior a 50 °C; em que as referidas etapas são, de um modo preferido, realizadas na ordem dada.

O auto-agrupamento da referida proteína de revestimento é mais eficiente quando a preparação oligonucleotídica compreende agregados compreendendo o tamanho de partícula óptimo e um tamanho de distribuição estreito. Além disso, foi surpreendentemente verificado que o estado de agregação do oligonucleótido pode ser controlado mais eficientemente e que as preparações oligonucleotídicas com um tamanho de distribuição mais estreito são obtidas quando o oligonucleótido é submetido a uma etapa de desagregação antes da etapa de agregação. O referido processo pode compreender qualquer uma das características e formas de realização aqui descritas em qualquer combinação.

Deste modo, um segundo aspecto da invenção é um processo para a produção de uma composição nucleotídica compreendendo um oligonucleótido, em que o referido oligonucleótido comporte um tempo de início do pico relativo de 50 a 110%, o referido processo compreendendo as etapas de: (a) proporcionar um oligonucleótido na solução I, em que o referido oligonucleótido comporte, pelo menos, uma extensão de poli G; e em que a referida solução I comporte um pH alcalino; (b) desagregação do referido oligonucleótido, em que a referida desagregação comporte as etapas de: (i) ajustamento da temperatura da solução I à temperatura I, em que a referida temperatura I é 4 a 70 °C; (ii) incubação do referido oligonucleótido na referida

solução I à referida temperatura I, em que a referida incubação é realizada até que o referido oligonucleótido compreenda um tempo de início do pico relativo superior a 110%; e (iii) ajustamento da temperatura da referida solução I à temperatura II, em que a referida temperatura II é 0 a 70 °C; (c) ajustamento do pH da referida solução I a pH 5 a 8; e (d) agregação do referido oligonucleótido, em que a referida agregação compreende as etapas de: (i) proporcionar o referido oligonucleótido na solução II, em que a referida solução II compreende pH 5 a 8 e um catião, em que, de um modo preferido, a concentração do referido catião na referida solução II é, pelo menos, 20 mM e em que, de um modo preferido, o referido catião é seleccionado do grupo consistindo de Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>, NH<sub>4</sub><sup>+</sup>, Li<sup>+</sup>, Ca<sup>2+</sup> e Mg<sup>2+</sup>; (ii) ajustamento da temperatura da solução II à temperatura III, em que a referida temperatura III é 50 a 99 °C; (iii) incubação do referido oligonucleótido na solução II à temperatura III, em que a referida incubação é realizada até que o referido oligonucleótido compreenda um tempo de inicio do pico relativo de 50 a 110%; e (iv) ajustamento da temperatura da solução II à temperatura IV, em que a referida temperatura IV é inferior a 50 °C; em que as referidas etapas são, de um modo preferido, realizadas na ordem dada. O referido processo pode compreender qualquer uma das características e formas de realização aqui descritas em qualquer combinação.

É descrita uma composição nucleotídica a qual compreende um oligonucleótido, em que a referida composição nucleotídica é obtenível por qualquer um dos processos descritos acima, em que, de um modo preferido, o referido oligonucleótido compreende um tempo de inicio do pico relativo de 50 a 110%. A referida composição nucleotídica pode compreender qualquer uma das

características e formas de realização aqui descritas em qualquer combinação.

Além do mais, é descrito um processo para a produção de uma composição, em que a referida composição compreende (i) uma partícula semelhante a vírus, em que a referida partícula semelhante a vírus é uma partícula semelhante a vírus de um bacteriófago de ARN e (ii) um oligonucleótido, em que o referido oligonucleótido está empacotado na referida partícula semelhante a vírus, o referido processo compreendendo as etapas de: (a) proporcionar proteína de revestimento do referido bacteriófago de ARN; (b) proporcionar uma composição nucleotídica compreendendo um oligonucleótido, em que a referida composição nucleotídica é uma composição nucleotídica obtinível por qualquer um dos processos do primeiro e do segundo aspectos da invenção; (c) produção de uma mistura, em que a referida mistura compreende: (i) a referida proteína de revestimento; (ii) um agente capaz de prevenir o auto-agrupamento da referida proteína de revestimento; (iii) o referido oligonucleótido; (d) remoção do referido agente da referida mistura; e (e) permitir que a referida proteína de revestimento se auto-agrupa numa partícula semelhante a vírus. O referido processo pode compreender qualquer uma das características e formas de realização aqui descritas em qualquer combinação.

Um quinto aspecto da invenção é um processo para a produção de uma composição compreendendo (i) uma partícula semelhante a vírus, em que a referida partícula semelhante a vírus é uma partícula semelhante a vírus de um bacteriófago de ARN e (ii) um oligonucleótido, em que o referido oligonucleótido está empacotado na referida partícula semelhante a vírus, o referido processo compreendendo as etapas de: (a) proporcionar proteína

de revestimento do referido bacteriófago de ARN; (b) proporcionar um oligonucleótido, (i) em que o referido oligonucleótido tem, pelo menos, uma extensão de poli G; e (ii) em que o referido oligonucleótido comprehende um tempo de início do pico relativo de 50 a 110%; (c) produção de uma mistura, em que a referida mistura comprehende: (i) a referida proteína de revestimento; (ii) um agente capaz de prevenir o auto-agrupamento da referida proteína de revestimento; (iii) o referido oligonucleótido; (d) remoção do referido agente da referida mistura; e (e) permitir que a referida proteína de revestimento se auto-agrupe numa partícula semelhante a vírus. O referido processo pode compreender qualquer uma das características e formas de realização aqui descritas em qualquer combinação.

Um sexto aspecto da invenção é um processo para a produção de uma composição compreendendo (i) uma partícula semelhante a vírus, em que a referida partícula semelhante a vírus é uma partícula semelhante a vírus de um bacteriófago de ARN e (ii) um oligonucleótido, em que o referido oligonucleótido está empacotado na referida partícula semelhante a vírus, o referido processo compreendendo as etapas de: (a) proporcionar proteína de revestimento do referido bacteriófago de ARN; (b) proporcionar um oligonucleótido, em que o referido oligonucleótido comprehende um tempo de início do pico relativo de 50 a 110%, o referido proporcionar compreendendo as etapas de: (i) proporcionar um oligonucleótido na solução II, em que a referida solução II comprehende pH 5 a 8 e um catião, em que, de um modo preferido, a concentração do referido catião na referida solução II é, pelo menos, 20 mM e em que, de um modo preferido, o referido catião é seleccionado do grupo consistindo de  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ ,  $\text{NH}_4^+$ ,  $\text{Li}^+$ ,  $\text{Ca}^{2+}$  e  $\text{Mg}^{2+}$ ; (ii) ajustamento da temperatura da

solução II à temperatura III, em que a referida temperatura III é 50 a 99 °C; e (iii) incubação do referido oligonucleótido na solução II à temperatura III, em que a referida incubação é realizada até que o referido oligonucleótido compreenda um tempo de início do pico relativo de 50 a 110%; e (iv) ajustamento da temperatura da solução II à temperatura IV, em que a referida temperatura IV é inferior a 50 °C; em que as etapas (i) a (iv) são, de um modo preferido, realizadas na ordem dada; (c) produção de uma mistura, em que a referida mistura compreende: (i) a referida proteína de revestimento; (ii) um agente capaz de prevenir o auto-agrupamento da referida proteína de revestimento; (iii) o referido oligonucleótido; (d) remoção do referido agente da referida mistura; e (e) permitir que a referida proteína de revestimento se auto-agrupe numa partícula semelhante a vírus. O referido processo pode compreender qualquer uma das características e formas de realização aqui descritas em qualquer combinação.

Um sétimo aspecto da invenção é um processo para a produção de uma composição compreendendo (i) uma partícula semelhante a vírus, em que a referida partícula semelhante a vírus é uma partícula semelhante a vírus de um bacteriófago de ARN e (ii) um oligonucleótido, em que o referido oligonucleótido está empacotado na referida partícula semelhante a vírus, o referido processo compreendendo as etapas de: (a) proporcionar proteína de revestimento do referido bacteriófago de ARN; (b) proporcionar um oligonucleótido, em que o referido oligonucleótido compreende um tempo de início do pico relativo de 50 a 110%, o referido proporcionar compreendendo as etapas de: (i) proporcionar um oligonucleótido na solução I, em que o referido oligonucleótido tem, pelo menos, uma extensão de poli G; e em que a referida solução I compreende um pH alcalino;

(ii) desagregação do referido oligonucleótido, em que a referida desagregação compreende as etapas de: (1) ajustamento da temperatura da solução I à temperatura I, em que a referida temperatura I é 4 a 70 °C; (2) incubação do referido oligonucleótido na referida solução I à referida temperatura I, em que a referida incubação é realizada até que o referido oligonucleótido compreenda um tempo de início do pico relativo superior a 110%; e (3) ajustamento da temperatura da referida solução I à temperatura II, em que a referida temperatura II é 0 a 70 °C; (iii) ajustamento do pH da referida solução I a pH 5 a 8; e (iv) agregação do referido oligonucleótido, em que a referida agregação compreende as etapas de: (1) proporcionar o referido oligonucleótido na solução II, em que a referida solução II compreende pH 5 a 8 e um catião, em que, de um modo preferido, a concentração do referido catião na referida solução II é, pelo menos, 20 mM e em que, de um modo preferido, o referido catião é seleccionado do grupo consistindo de Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>, NH<sub>4</sub><sup>+</sup>, Li<sup>+</sup>, Ca<sup>2+</sup> e Mg<sup>2+</sup>; (2) ajustamento da temperatura da solução II à temperatura III, em que a referida temperatura III é 50 a 99 °C; (3) incubação do referido oligonucleótido na solução II à temperatura III, em que a referida incubação é realizada até que o referido oligonucleótido compreenda um tempo de início do pico relativo de 50 a 110%; e (4) ajustamento da temperatura da solução II à temperatura IV, em que a referida temperatura IV é inferior a 50 °C; em que as etapas (i) a (iv) são, de um modo preferido, realizadas na ordem dada; (c) produção de uma mistura, em que a referida mistura compreende: (i) a referida proteína de revestimento; (ii) um agente capaz de prevenir o auto-agrupamento da referida proteína de revestimento; (iii) o referido oligonucleótido; (d) remoção do referido agente da referida mistura; e (e) permitir que a referida proteína de revestimento se auto-agrupe numa partícula

semelhante a vírus. O referido processo pode compreender qualquer uma das características e formas de realização aqui descritas em qualquer combinação.

Além disso, é descrita a utilização de uma composição nucleotídica, em que a referida composição nucleotídica é obtinível por qualquer um dos processos da invenção, num processo para a produção de uma composição compreendendo (i) uma partícula semelhante a vírus, em que a referida partícula semelhante a vírus é uma partícula semelhante a vírus de um bacteriófago de ARN e (ii) um oligonucleótido, em que o referido oligonucleótido está empacotado na referida partícula semelhante a vírus.

Além disso, é descrita uma composição obtenível por qualquer um dos processos da invenção, a referida composição compreendendo (i) uma partícula semelhante a vírus, em que a referida partícula semelhante a vírus é uma partícula semelhante a vírus de um bacteriófago de ARN e (ii) um oligonucleótido, em que o referido oligonucleótido está empacotado na referida partícula semelhante a vírus, em que, de um modo preferido, o referido bacteriófago de ARN é Q $\beta$  e em que, de um modo preferido, adicional, o referido oligonucleótido é G8-8 (SEQ ID N°: 6) ou G10 (SEQ ID N°: 8), de um modo preferido, G10 (SEQ ID N°: 8) e em que, de um modo ainda mais preferido, a pureza da referida composição é, pelo menos, pelo menos 98%, de um modo mais preferido, pelo menos, 99% e, de um modo muito preferido, pelo menos, 99,2%.

## **BREVE DESCRIÇÃO DOS DESENHOS**

**Figura 1: Cromatograma de HPLC de exclusão de tamanho do padrão da cápside de Q $\beta$  (topo) e G10 agregado (baixo).** O HPLC foi realizado como descrito no Exemplo 4. O tempo de retenção do padrão foi 8,532 min, o tempo de início do pico de G10 agregado foi 7,510 min. Deste modo, o tempo de início do pico relativo do G10 agregado foi 88% (7,510 min/8,532 min \* 100).

**Figura 2: Cromatograma de HPLC de exclusão de tamanho de G10 não tratado, oligonucleótido G10 agregado e padrão da cápside de Q $\beta$ .** O HPLC foi realizado como descrito no Exemplo 4. (A) O G10 agregado que não foi submetido a um tratamento de desagregação antes da agregação mostrou um peso molecular aparente equivalente ou superior à cápside de Q $\beta$  (A, caixa 2). O tempo de início do pico relativo foi cerca de 75%. (B) o G10 agregado que, antes da agregação, foi submetido a um tratamento de desagregação, como descrito no Exemplo 1, exibiu um peso molecular aparente inferior à cápside de Q $\beta$  (B, caixa 2). O tempo de início do pico relativo foi cerca de 88%.

**Figura 3: Espectros de CD de oligonucleótido de G10 não tratado, desagregado e agregado e VLP reagrupado empacotado com G10.** Os espectros foram registados utilizando concentrações oligonucleotídicas de 22,5  $\mu$ M e, subsequentemente, normalizados. Para normalização, as elipticidades são calculadas de acordo com  $\Theta = 100 \times$  sinal de CD [mdeg]/L [cm]  $\times$  c [mM].

**Figura 4: Caracterização de proteína de revestimento de Q $\beta$  purificada por cromatografia analítica de exclusão de tamanho.** (A) amostra de VLP de Q $\beta$  purificada. O pico observado (razão A260/A280 = 2) é dominado pelo núcleo de ARN da VLP, porque o

coeficiente de absorção de ARN a 260 nm é, aproximadamente, 100 vezes superior ao coeficiente de absorção da proteína de revestimento. (B) amostra do sobrenadante da reacção de desagrupamento. A proteína de revestimento libertada é indicada pela presença do pico semelhante a proteína a, aproximadamente, 12 min. Além disso, várias espécies de moléculas de ARN não precipitadas estão presentes na gama 6,8 a 11 min. (C) amostra de proteína de revestimento de Q $\beta$  purificada. A análise foi realizada em PBS na coluna TSK G5000PWx1 (Tosoh Bioscience).

**Figura 5: Cromatografia analítica de exclusão de tamanho de (A) VLP de Q $\beta$  nativa, (D) VLP de Q $\beta$ G10 e os componentes de empacotamento (B) oligonucleótido G10 e (C) proteína de revestimento de Q $\beta$ .** O pico observado para VLP de Q $\beta$ G10 (D) (razão A260/A280 = 1,74) é dominado pelo núcleo de G10 da VLP, porque o coeficiente de absorção de G10 a 260 nm é, aproximadamente, 130 vezes superior ao coeficiente de absorção da proteína de revestimento. A análise foi realizada em PBS na coluna TSK G5000PWx1 (Tosoh Bioscience).

**Figura 6: Análise de SDS-PAGE não redutor de VLP de Q $\beta$  nativa e Q $\beta$ G10 agrupada *in vitro*.** A posição dos pentâmeros e hexâmeros da proteína de revestimento está indicada ((a) marcador de peso molecular, (b) VLP de Q $\beta$ , (c) G10 de Q $\beta$ ).

## **DESCRICAÇÃO DETALHADA DA INVENÇÃO**

As definições e formas de realização descritas no que se segue são, salvo explicitamente indicado em contrário, aplicáveis a qualquer um dos aspectos e formas de realização, em particular processos, composições, composições nucleotídicas e

utilizações da invenção. Salvo definição em contrário, todos os termos técnicos e científicos aqui utilizados têm os mesmos significados como geralmente compreendido por alguém com conhecimentos gerais na técnica a que esta invenção pertence.

**"oligonucleótido":** O termo oligonucleótido, como aqui utilizado, refere-se a um desoxirribonucleótido de cadeia simples. Um oligonucleótido preferido, compreende, pelo menos, uma extensão de poli G, como definido abaixo. Os oligonucleótidos mais preferidos compreendem 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 ou 10 dos referidos segmentos de poli G. Os oligonucleótidos muito preferidos compreendem, exactamente, dois segmentos de poli G, em que, de um modo preferido, um dos referidos dois segmentos de poli G está localizado na extremidade 5' ou na extremidade 3' do referido oligonucleótido. De um modo ainda mais preferido, os oligonucleótidos compreendem, exactamente, dois segmentos de poli G, em que um dos referidos dois segmentos de poli G está localizado na extremidade 5' do referido oligonucleótido e um dos referidos dois segmentos de poli G está localizado na extremidade 3' do referido oligonucleótido. Tipicamente e, de um modo preferido, um oligonucleótido, como aqui utilizado, consiste de 6 a 1000, de um modo preferido, de 10 a 1000, de um modo mais preferido, de 10 a 200, de um modo ainda mais preferido, de 10 a 100, de um modo ainda mais preferido, de 20 a 40 e, de um modo muito preferido, de 30 nucleótidos. Os oligonucleótidos preferidos adicionais consistem de 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 ou 40 nucleótidos. Os oligonucleótidos ainda mais preferidos consistem de 24 a 32 nucleótidos, de um modo mais preferido, de cerca de 30 nucleótidos.

O termo oligonucleótido também se refere a moléculas compreendendo, pelo menos, um nucleótido modificado, em que, de um modo preferido, o referido nucleótido modificado é seleccionado de (a) um análogo nucleotídico ou (b) um nucleótido compreendendo uma modificação de esqueleto. Numa forma de realização, o oligonucleótido comprehende, pelo menos, um nucleótido modificado seleccionado do grupo consistindo de (a) ácido nucleico peptídico, (b) inosina, (c) bases tritiladas, (d) fosforotioatos, (e) alquilfosforotioatos, (f) 5-nitroindole desoxirribofuranosilo, (g) 5-metildesoxicitosina e (h) 5,6-di-hidro-5,6-di-hidroxidesoxitimidina. Numa forma de realização adicional, o oligonucleótido comprehende ou, alternativamente, consiste de nucleótidos fosfotioados. Os nucleótidos fosfotioados estão protegidos contra degradação numa célula ou um organismo e são, por conseguinte, modificações nucleotídicas preferidas. São ainda preferidas as formas quimicamente, enzimaticamente ou metabolicamente modificadas de polinucleótidos como tipicamente verificados na natureza. Contudo, os oligonucleótidos preferidos consistem, exclusivamente, de nucleótidos não modificados, *i. e.*, de adenosina, timidina, guanosina e/ou citidina. Os oligonucleótidos ainda mais preferidos consistem, exclusivamente, de nucleótidos ligados a fosfodiéster.

Os oligonucleótidos muito preferidos são CpG não metilado contendo oligonucleótidos compreendendo, pelo menos, um, de um modo preferido, um, dois, três ou quatro motivos de CpG. Os oligonucleótidos ainda mais preferidos compreendem uma sequência palindrómica, em que, de um modo preferido, a referida sequência palindrómica comprehende, pelo menos, um, de um modo preferido, um, dois, três ou quatro motivos de CpG. Os oligonucleótidos ainda mais preferidos compreendem uma sequência palindrómica, em

que, de um modo preferido, a referida sequência palindrómica comprehende ou, de um modo preferido, consiste na sequência GACGATCGTC (SEQ ID N°: 1). Os oligonucleótidos ainda mais preferidos comprehendem uma sequência palindrómica, em que a referida sequência palindrómica está flanqueada na sua extremidade 5' por uma extensão de poli G e em que a referida sequência palindrómica é GACGATCGTC (SEQ ID N°: 1). Os oligonucleótidos muito preferidos comprehendem uma sequência palindrómica, em que a referida sequência palindrómica está flanqueada na sua extremidade 5' por, pelo menos, 3 a 10, de um modo preferido, por 4 a 10 entidades de guanosina e em que a referida sequência palindrómica está flanqueada na sua extremidade 3' por, pelo menos, 3 a 10, de um modo preferido, por 4 a 10 entidades de guanosina, em que, de um modo preferido, a referida sequência palindrómica é GACGATCGTC (SEQ ID N°: 1).

**"extensão de poli G":** A expressão extensão de poli G refere-se a um segmento de um oligonucleótido, em que o referido segmento consiste de, pelo menos, 3 resíduos de guanosina consecutivos. As extensões de poli G preferidas consistem de 3 a 25, de um modo preferido, de 4 a 20, de um modo mais preferido, de 4 a 15 e, de um modo muito preferido, de 4 a 10 entidades de guanosina consecutivas. As extensões de poli G preferidas adicionais consistem de 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19 ou 20 entidades de guanosina consecutivas.

**"motivo de CpG":** Como aqui utilizada, a expressão "motivo de CpG" refere-se a uma curta sequência de ADN, de um modo preferido, uma sequência de ADN de cadeia simples, compreendendo um dinucleótido de citosina (C) - guanosina (G), em que o C não

está metilado e em que, de um modo preferido, o referido dinucleótido de CG está ligado por fosfodiéster. De um modo preferido, um motivo de CpG compreende, pelo menos, um, de um modo preferido, um, dois ou três, nucleótidos 5' e/ou 3' adicionais do referido dinucleótido de CG, em que, de um modo preferido, adicional, os referidos nucleótidos adicionais não compreendem um dinucleótido de CG.

**"tempo de início do pico relativo":** A expressão "tempo de início do pico relativo" é um parâmetro que é indicativo do estado de agregação de um oligonucleótido. O tempo de início do pico relativo de um oligonucleótido é determinado por HPLC analítica de exclusão de tamanho com os seguintes parâmetros:

Coluna: TSKgel 5000 PWXL 7,8 mm \* 30,0 cm (Lote: 5PWX06GNMH3304, Art: 08023, Tosoh Bioscience)

Eluente: PBS (NaCl a 150 mM em tampão de fosfato de sódio a 20 mM, pH 7,2)

Volume de injeção: 40,0 µL (de um modo preferido, compreendendo uma concentração de cerca de 20 µM a cerca de 500 µM)

Caudal: 0,8 mL/min

Gradiente: Isocrático

Tempo de corrida: 20 min

Comprimento de onda: 215, 260 e 280 nm, avaliação de dados a 260 nm

Temp. de estufa de coluna: 25 °C

Temp. de amostrador automático: 8 °C;

e em que a cápside do referido bacteriófago de ARN é utilizada como um padrão. O tempo de início do pico relativo X% do referido oligonucleótido relativamente à cápside do referido bacteriófago de ARN é calculado como se segue: X% = tempo de início do pico [min] do oligonucleótido dividido pelo tempo de retenção do padrão [min] x 100%, em que o tempo de início do pico do oligonucleótido é determinado como o tempo quando a eluição do oligonucleótido se torna detectável e em que o tempo de retenção do padrão é determinado como o tempo da ocorrência do pico máximo do referido padrão. Deste modo, numa forma de realização em que o referido bacteriófago de ARN é, por exemplo, o bacteriófago AP205, a cápside de AP205 é utilizada como padrão no referido HPLC e o tempo de início do pico relativo do referido oligonucleótido é calculado relativamente ao referido padrão de AP205. Facto importante, em formas de realização que não se referem a um bacteriófago de ARN, o tempo de início do pico relativo é sempre determinado pela utilização da cápside do bacteriófago Q $\beta$  como padrão. Além disso, no caso de qualquer incerteza em relação à escolha do padrão apropriado no referido HPLC, a cápside do bacteriófago Q $\beta$  é utilizada como padrão e o tempo de início do pico relativo é determinado relativamente à referida cápside do bacteriófago Q $\beta$ . Deste modo, numa forma de realização muito preferida, o referido tempo de início do pico relativo é determinado pelo referido HPLC, em que, de um modo preferido, o referido padrão é a cápside do bacteriófago Q $\beta$  e em que, de um modo preferido, adicional, o referido tempo de início do pico relativo é determinado relativamente à referida cápside do bacteriófago Q $\beta$ .

**"empacotado"**: O termo "empacotado", como aqui utilizado, refere-se ao estado de um oligonucleótido, em relação à partícula semelhante a vírus. A utilização das expressões

“oligonucleótido empacotado em VLP” ou “VLP empacotada com oligonucleótido” é equivalente. O termo “empacotado”, como aqui utilizado, refere-se a ligação não covalente, de um modo preferido, a interacções iónicas, interacções hidrófobas ou ligações de hidrogénio. De um modo muito preferido, o termo “empacotado”, como aqui utilizado, refere-se ao encerramento, ou encerramento parcial, do referido oligonucleótido na VLP. Por exemplo, o oligonucleótido, de um modo preferido, o oligonucleótido compreendendo um tempo de início do pico relativo de 50 a 110%, pode estar encerrado pela VLP sem a existência de uma ligação real, nem covalentemente nem não covalentemente, ou com uma ligação não covalente. Tipicamente e, de um modo preferido, uma VLP empacotada com oligonucleótido protege o referido oligonucleótido da degradação, de um modo preferido, da hidrólise de DNase. Por conseguinte, no significado preferido, o termo “empacotado” indica que o oligonucleótido num estado empacotado não está acessível a hidrólise de DNase. De um modo mais preferido, o termo “empacotado” indica que o oligonucleótido não está acessível a hidrólise de DNase, em que, de um modo preferido, adicional, a DNase é DNaseI ou Benzonase. De um modo ainda mais preferido, o termo “empacotado” indica que o oligonucleótido não está acessível a hidrólise de Benzonase.

A acessibilidade do oligonucleótido para DNase (e. g., DNaseI ou Benzonase) é, de um modo preferido, ensaiada como descrito nos Exemplos 11-17 do documento W02003/024481A2 (ver a p. 111 neste). Num significado preferido, uma VLP é considerada como estando empacotada com um oligonucleótido quando, após tratamento com Benzonase (190 U de Benzonase/mg de proteína de revestimento, num tampão compreendendo MgCl<sub>2</sub> a 2 mM, pH 7,2, 20-25 °C, 18 h), pelo menos, 90%, de um modo preferido, pelo

menos, 95%, de um modo muito preferido, pelo menos, 98% do referido oligonucleótido pode ser recuperado da referida VLP (e. g., num gel corado com brometo de etídio). É evidente para o especialista que esses ensaios requerem controlos apropriados e podem necessitar de ser adaptados à combinação específica de VLP e oligonucleótido. Num significado mais preferido, um oligonucleótido é considerado como estando empacotado numa VLP de um bacteriófago de ARN quando, após tratamento com Benzonase (190 U de Benzonase/mg de proteína de revestimento, num tampão compreendendo MgCl<sub>2</sub> a 2 mM, pH 7,2, 20-25 °C, 18 h), pelo menos, 90%, de um modo preferido, pelo menos, 95%, de um modo muito preferido, pelo menos, 98% do referido oligonucleótido pode ser recuperado da referida VLP de um bacteriófago de ARN). Num significado muito preferido, o oligonucleótido G10 (SEQ ID N°: 8) é considerado como estando empacotado numa VLP de um bacteriófago de ARN quando, após tratamento com Benzonase (190 U de Benzonase/mg de proteína de revestimento, num tampão compreendendo MgCl<sub>2</sub> a 2 mM, pH 7,2, 20-25 °C, 18 h), pelo menos, 90%, de um modo preferido, pelo menos, 95%, de um modo muito preferido, pelo menos, 98% do referido G10 pode ser recuperado da referida VLP. Num significado mais específico, o oligonucleótido G10 (SEQ ID N°: 8) é considerado como estando empacotado numa VLP de um bacteriófago Qβ, AP205, GA ou fr de ARN quando, após tratamento com Benzonase (190 U de Benzonase/mg de proteína de revestimento, num tampão compreendendo MgCl<sub>2</sub> a 2 mM, pH 7,2, 20-25 °C, 18 h), pelo menos, 90%, de um modo preferido, pelo menos, 95%, de um modo muito preferido, pelo menos, 98% do referido G10 pode ser recuperado da referida VLP de um bacteriófago de ARN. Num significado muito específico, o oligonucleótido G10 (SEQ ID N°: 8) é considerado como estando empacotado numa VLP de um bacteriófago Qβ de ARN quando, após tratamento com Benzonase (190 U de Benzonase/mg de proteína de

revestimento, num tampão compreendendo MgCl<sub>2</sub> a 2 mM, pH 7,2, 20-25 °C, 18 h), pelo menos, 90%, de um modo preferido, pelo menos, 95%, de um modo muito preferido, pelo menos, 98% do referido oligonucleótido contendo CpG não metilado pode ser recuperado da referida VLP do bacteriófago Qβ de ARN.

**"proteína de revestimento":** Como aqui utilizada, a expressão "proteína de revestimento" refere-se à ou às proteínas de um bacteriófago de ARN capazes de serem incorporadas no agrupamento de cápside do bacteriófago ou o bacteriófago de ARN. Deste modo, o termo proteína de revestimento refere-se à proteína formando a cápside de um bacteriófago de ARN ou uma VLP de um bacteriófago de ARN. Tipicamente e, de um modo preferido, a proteína de revestimento de bacteriófagos de ARN tem uma estrutura dimérica.

**"fragmento de uma proteína de revestimento (recombinante)",** em particular, o fragmento de uma proteína de revestimento recombinante, como aqui utilizado, é definido como um polipéptido que tem, pelo menos, 70%, de um modo preferido, pelo menos, 80%, de um modo mais preferido, pelo menos, 90%, de um modo ainda mais preferido, pelo menos, 95% do comprimento da proteína de revestimento de tipo selvagem ou proteína recombinante de tipo selvagem, respectivamente e que, de um modo preferido, retém a capacidade de formar VLP. De um modo preferido, o fragmento é obtido por, pelo menos, uma deleção interna, pelo menos, um truncamento ou, pelo menos, uma sua combinação. A expressão "fragmento de uma proteína de revestimento recombinante" ou "fragmento de uma proteína de revestimento" deverá, ainda, abranger polipéptido, que tem, pelo menos, 80%, de um modo preferido, 90%, de um modo ainda mais preferido, 95% de identidade de sequência de aminoácidos com a

proteína de revestimento de tipo selvagem, respectivamente e que é, de um modo preferido, capaz de se agrupar numa partícula semelhante a vírus. A expressão "proteína de revestimento mutante" refere-se a um polipeptídeo tendo uma sequência de aminoácidos derivada da proteína recombinante de tipo selvagem, ou proteína de revestimento, respectivamente, em que a sequência de aminoácidos é, pelo menos, 80%, de um modo preferido, pelo menos, 85%, 90%, 95%, 97% ou 99% idêntica à sequência de tipo selvagem e, de um modo preferido, retém a capacidade de se agrupar numa VLP.

**"partícula semelhante a vírus (VLP)"**, como aqui utilizado, refere-se a uma partícula de vírus não replicativa ou não infecciosa, de um modo preferido, uma partícula de vírus não replicativa e não infecciosa, ou refere-se a uma estrutura não replicativa ou não infecciosa, de um modo preferido, uma estrutura não replicativa e não infecciosa, assemelhando-se a uma partícula de vírus, de um modo preferido, uma cápside de um vírus. A expressão "não replicativa", como aqui utilizado, refere-se a ser incapaz de replicar o genoma abrangido pela VLP. A expressão "não infecciosa", como aqui utilizada, refere-se a ser incapaz de entrar na célula hospedeira. De um modo preferido, uma partícula semelhante a vírus de acordo com a invenção é não replicativa e/ou não infecciosa, visto que está desprovida da totalidade ou parte do genoma viral ou função de genoma. Numa forma de realização, uma partícula semelhante a vírus é uma partícula de vírus, na qual o genoma viral foi fisicamente ou quimicamente inativado, removido pelo desagrupamento e reagrupamento, ou por agrupamento de proteínas purificadas numa VLP. Tipicamente e, de um modo mais preferido, uma partícula semelhante a vírus está desprovida da totalidade ou parte dos componentes replicativos e infecciosos do genoma

viral. Uma partícula semelhante a vírus de acordo com a invenção pode conter ácido nucleico distinto do seu genoma. Uma forma de realização típica e preferida de uma partícula semelhante a vírus de acordo com a presente invenção é uma cápside viral, tal como a cápside viral do correspondente vírus, bacteriófago, de um modo preferido, bacteriófago de ARN. O termo "cápside", refere-se a um agrupamento macromolecular composto por subunidades de proteína viral. Tipicamente, existem 60, 120, 180, 240, 300, 360 e mais de 360 subunidades de proteína viral. Tipicamente e, de um modo preferido, as interacções destas subunidades conduzem à formação da cápside viral com uma organização repetitiva inerente, em que a referida estrutura é tipicamente e, de um modo preferido, esférica. Por exemplo, as cápsides de bacteriófagos de ARN têm uma forma de esférica de simetria icosaédrica.

**"partícula semelhante a vírus de um bacteriófago de ARN":**

Como aqui utilizada, a expressão "partícula semelhante a vírus de um bacteriófago de ARN" refere-se a uma partícula semelhante a vírus compreendendo ou, de um modo preferido, consistindo essencialmente ou consistindo de proteínas de revestimento, mutantes ou os seus fragmentos, de um bacteriófago de ARN. Além disso, a partícula semelhante a vírus de um bacteriófago de ARN assemelhando-se à estrutura de um bacteriófago de ARN, sendo não replicativa e/ou não infecciosa e desprovida, pelo menos, do gene ou genes codificando para a maquinaria de replicação do bacteriófago de ARN e, tipicamente, também desprovida do gene ou genes codificando a proteína ou proteínas responsáveis pela conjugação viral ou entrada no hospedeiro. As VLP preferidas derivadas de bacteriófagos de ARN exibem simetria icosaédrica e consistem de 180 subunidades. No contexto da invenção, o termo partícula semelhante a vírus de um bacteriófago de ARN

refere-se, de um modo preferido, a uma estrutura macromolecular obtida pelo auto-agrupamento de proteína de revestimento recombinante de um bacteriófago de ARN, ou os seus fragmentos ou mutantes, em que, de um modo preferido, o referido auto-agrupamento ocorreu na presença de um oligonucleótido.

**"agente capaz de prevenir o auto-agrupamento da proteína de revestimento"**: Um agente capaz de prevenir o auto-agrupamento da proteína de revestimento é um agente que previne a formação espontânea de partículas semelhantes a vírus na referida mistura. O especialista é capaz de determinar a natureza química e a concentração apropriada do referido agente experimentalmente, e. g., pela análise da referida mistura por cromatografia de exclusão de tamanho, como divulgado no Exemplo 9. Um agente é capaz de prevenir o auto-agrupamento da proteína de revestimento quando, após incubação da referida mistura durante, pelo menos, 1 h, à temperatura ambiente, de um modo preferido, a 22 °C, não é detectável partícula semelhante a vírus pela cromatografia de exclusão de tamanho, divulgada no Exemplo 9. Contudo, o agente que é capaz de prevenir o auto-agrupamento da proteína de revestimento não modifica irreversivelmente a referida proteína de revestimento e a remoção do referido agente da referida mistura irá resultar na formação espontânea de partículas semelhantes a vírus. Os agentes preferidos capazes de prevenirem o auto-agrupamento da proteína de revestimento compreendem detergentes, cloridrato de guanidínio e ureia, de um modo muito preferido, ureia. Os detergentes preferidos são dodecilssulfato de sódio, Tween 20, TritonX 100 e semelhantes. Tipicamente e, de um modo preferido, os agentes capazes de prevenirem o auto-agrupamento da proteína de revestimento compreendem, ainda, um agente de redução que mantém as ligações persulfureto intermoleculares formadas por

resíduos de cisteína da referida proteína de revestimento num estado reduzido.

**"rendimento de proteína":** O rendimento de proteína de um processo da invenção é determinado como a quantidade de proteína de revestimento recuperada como partícula semelhante a vírus após a última etapa do referido processo, relativamente à quantidade de proteína de revestimento contida na referida mistura, em que, de um modo preferido, a quantidade da referida proteína de revestimento é determinada pelo ensaio de proteína de Bradford. Tipicamente e, de um modo preferido, pelo menos, 70%, de um modo preferido, pelo menos, 75% da proteína de revestimento contida na referida mistura é recuperada como partícula semelhante a vírus após a etapa final do referido processo, em que, de um modo preferido, a referida etapa final é referida como filtração estéril.

**"rendimento de oligonucleótido":** O rendimento de oligonucleótido de um processo da invenção é determinado como a quantidade de oligonucleótido que pode ser recuperada da referida partícula semelhante a vírus após a última etapa do referido processo relativamente à quantidade do referido oligonucleótido contida na referida mistura, em que, de um modo preferido, a quantidade do referido oligonucleótido recuperado da referida partícula semelhante a vírus é determinada essencialmente ou, de um modo preferido, exactamente como divulgado no Exemplo 9. Tipicamente e, de um modo preferido, pelo menos, 70%, de um modo preferido, pelo menos, 75% do oligonucleótido contido na referida mistura é recuperado da referida partícula semelhante a vírus após a etapa final do referido processo, em que, de um modo preferido, a referida etapa final é referida como filtração estéril.

**"pureza":** A pureza de uma composição da invenção compreendendo (i) uma partícula semelhante a vírus, em que a referida partícula semelhante a vírus é uma partícula semelhante a vírus de um bacteriófago de ARN e (ii) um oligonucleotídeo, em que o referido oligonucleotídeo está empacotado na referida partícula semelhante a vírus, é determinada por HPLC analítico de exclusão de tamanho, em que o referido HPLC é realizado sob condições essencialmente, de um modo preferido, exactamente, como divulgadas no Exemplo 4. A pureza da referida composição é determinada como a percentagem da área de pico da referida partícula semelhante a vírus contida na referida composição, relativamente à área de pico total do mesmo cromatograma. Tipicamente e, de um modo preferido, a pureza de uma composição da invenção é, pelo menos, 98%, de um modo preferido, pelo menos, 99%.

**"um", "o/a":** Quando os termos "um", "o" ou "a" são utilizados nesta divulgação, salvo indicação em contrário, podem significar "pelo menos um" ou "um ou mais".

**"cerca de":** na acepção do presente pedido, a expressão cerca de deverá ter o significado de +/- 10%. Por exemplo cerca de 100 deverá significar 90 a 110.

A invenção proporciona processos para a produção de uma composição nucleotídica compreendendo um oligonucleotídeo agregado. Em maior detalhe, a invenção proporciona um processo para a produção de uma composição nucleotídica compreendendo um oligonucleotídeo, em que, de um modo preferido, o referido oligonucleotídeo compreende um tempo de início do pico relativo de 50 a 110%, o referido processo compreendendo as etapas de: (a) proporcionar um oligonucleotídeo numa solução II, em que o

referido oligonucleótido comprehende, de um modo preferido, na sua extremidade 5', pelo menos, 3 entidades de guanosina e na sua extremidade 3', pelo menos, 3 entidades de guanosina; e em que a referida solução II comprehende um pH de 5 a 8; e em que a referida solução II comprehende um catião, em que, de um modo preferido, a concentração do referido catião na referida solução II é, pelo menos, 20 mM, em que o referido catião é, de um modo preferido, seleccionado do grupo consistindo de Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>, NH<sub>4</sub><sup>+</sup>, Li<sup>+</sup>, Ca<sup>2+</sup> e Mg<sup>2+</sup>; (b) ajustamento da temperatura da solução II à temperatura III, em que a referida temperatura III é 50 a 99 °C; e (c) incubação do referido oligonucleótido na solução II à temperatura III, em que a referida incubação é realizada até que o referido oligonucleótido comprehenda um tempo de início do pico relativo de 50 a 110%; e e (d) ajustamento da temperatura da solução II à temperatura IV, em que a referida temperatura IV é inferior a 50 °C; em que as referidas etapas são, de um modo preferido, realizadas na ordem dada. Todas as formas de realização descritas em seguida são aplicáveis a este processo em qualquer combinação.

Como mencionado acima, verificou-se que, antes da referida etapa de agregação, é vantajoso submeter o referido oligonucleótido a uma etapa de desagregação, em que, de um modo preferido, o referido oligonucleótido é completamente desagregado. A desagregação completa do oligonucleótido significa que o peso molecular aparente do oligonucleótido em HPLC de exclusão de tamanho, de um modo preferido, efectuado essencialmente como descrito no Exemplo 4, corresponde ao peso molecular que pode ser derivado de uma sequência do referido oligonucleótido. Deste modo, a invenção proporciona, ainda, um processo para a produção de uma composição nucleotídica comprehendendo um oligonucleótido, em que, de um modo preferido,

o referido oligonucleótido compreende um tempo de início do pico relativo de 50 a 110%, o referido processo compreendendo as etapas de: (a) proporcionar um oligonucleótido na solução I, em que o referido oligonucleótido compreende, pelo menos, uma extensão de poli G; e em que a referida solução I compreende um pH alcalino; (b) desagregação do referido oligonucleótido, em que a referida desagregação compreende as etapas de: (i) ajustamento da temperatura da solução I à temperatura I, em que a referida temperatura I é 4 a 70 °C; (ii) incubação do referido oligonucleótido na referida solução I à referida temperatura I, em que a referida incubação é realizada até que o referido oligonucleótido compreenda um tempo de início do pico relativo superior a 110%; e (iii) ajustamento da temperatura da referida solução I à temperatura II, em que a referida temperatura II é 0 a 70 °C; (c) ajustamento do pH da referida solução I a pH 5 a 8; e (d) agregação do referido oligonucleótido, em que a referida agregação compreende as etapas de: (i) proporcionar o referido oligonucleótido na solução II, em que a referida solução II compreende pH 5 a 8 e um catião, em que, de um modo preferido, a concentração do referido catião na referida solução II é, pelo menos, 20 mM e em que, de um modo preferido, o referido catião é seleccionado do grupo consistindo de Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>, NH<sub>4</sub><sup>+</sup>, Li<sup>+</sup>, Ca<sup>2+</sup> e Mg<sup>2+</sup>; (ii) ajustamento da temperatura da solução II à temperatura III, em que a referida temperatura III é 50 a 99 °C; (iii) incubação do referido oligonucleótido na solução II à temperatura III, em que a referida incubação é realizada até que o referido oligonucleótido compreenda um tempo de inicio do pico relativo de 50 a 110%; e (iv) ajustamento da temperatura da solução II à temperatura IV, em que a referida temperatura IV é inferior a 50 °C; em que as referidas etapas são, de um modo preferido, realizadas na ordem dada.

A desagregação de oligonucleótido não tratado que pode compreender oligonucleótido parcialmente agregado ocorre a pH alcalino. O processo de desagregação pode ser facilitado por temperatura elevada.

Deste modo, numa forma de realização, a solução I compreende um pH de 8 a 13, de um modo preferido, 10 a 13, de um modo muito preferido, 12. A solução I pode compreender qualquer tampão ou o agente pode compreender qualquer tampão ou agente conhecido na técnica que permita ajustar o pH entre 8 e 13. Numa forma de realização preferida, a solução I compreende hidróxido, de um modo preferido, um hidróxido metálico, de um modo muito preferido, um hidróxido de um metal alcalino ou um metal alcalino-terroso, de um modo preferido, um hidróxido de um metal alcalino. Numa forma de realização preferida, o referido hidróxido é hidróxido de potássio ou hidróxido de sódio, de um modo muito preferido, hidróxido de sódio. Numa forma de realização, a concentração do referido hidróxido, de um modo preferido, do referido hidróxido de sódio, na referida solução I é 10 mM a 200 mM, de um modo mais preferido, cerca de 25 mM, de um modo muito preferido, 25 mM.

Para evitar a degradação do oligonucleótido, a temperatura I, de um modo preferido, não excede 90 °C, a temperatura I não excede 70 °C. Numa forma de realização, a temperatura I é temperatura ambiente, de um modo preferido, 19 a 25 °C. Noutra forma de realização, a temperatura I é 4 a 70 °C, de um modo preferido, 20 a 70 °C, de um modo mais preferido, 45 a 70 °C, de um modo preferido, cerca de 50 °C e, de um modo muito preferido, 50 °C. Numa forma de realização preferida, a referida incubação do referido oligonucleótido na referida solução I à referida temperatura I é realizada até que o

referido oligonucleótido esteja completamente desagregado. Noutra forma de realização, a referida incubação do referido oligonucleótido na referida solução I à referida temperatura I é realizada até que o tempo de início do pico relativo do referido oligonucleótido esteja acima de 110%, de um modo preferido, acima de 130% e, de um modo muito preferido, acima de 135%. Numa forma de realização adicional, a referida incubação do referido oligonucleótido na referida solução I à referida temperatura I é realizada durante 30 a 190 min, de um modo preferido, durante 50 a 90 min, de um modo muito preferido, durante 70 min.

Numa forma de realização preferida adicional, a concentração do referido oligonucleótido na referida solução I é 50  $\mu$ M a 2 mM, de um modo preferido, 50 a 500  $\mu$ M, de um modo mais preferido, 200 a 300  $\mu$ M e, de um modo muito preferido, 260  $\mu$ M.

A desagregação do oligonucleótido pode ser terminada pela neutralização ou acidificação da solução I e/ou redução da temperatura. Deste modo, o referido processo comprehende, ainda, a etapa de ajustamento do pH da referida solução I a pH 8 ou abaixo, de um modo preferido, a pH 5 a 8. Numa forma de realização preferida, o referido ajustamento do pH é realizado até que o referido pH seja 6 a 7, de um modo muito preferido, até que o referido pH seja cerca de 6. Numa forma de realização adicional, o referido ajustamento do pH da referida solução I é realizado pela adição de ácido à referida solução I. Para este efeito, pode ser utilizado qualquer ácido mineral ou orgânico conhecido na técnica. Numa forma de realização preferida, o referido ácido é seleccionado do grupo consistindo de ácido fosfórico; ácido clorídrico; e ácidos orgânicos, em que os referidos ácidos orgânicos são, de um modo preferido, seleccionados de ácido fórmico, ácido acético e ácido cítrico.

Numa forma de realização preferida, o referido ácido é um ácido mineral. De um modo preferido, o referido ácido é ácido fosfórico ou ácido clorídrico, de um modo muito preferido, ácido fosfórico.

O referido processo comprehende, ainda, o ajustamento da temperatura da referida solução I à temperatura II, em que, de um modo preferido, a referida temperatura II é 0 a 70 °C e em que, de um modo preferido, a referida temperatura II é inferior à temperatura I. Numa forma de realização preferida, a referida temperatura II é 0 a 25 °C, de um modo preferido, 0 a 10 °C e, de um modo muito preferido, 0 a 2 °C.

O processo comprehende, ainda, a etapa de agregação do referido oligonucleótido. A agregação do oligonucleótido é alcançada pela incubação do referido oligonucleótido a cerca de pH neutro, numa solução comprehendendo catiões capazes de suportarem a formação de estruturas de ADN de quadrúplice de G (cf. Simonsson T., *BioL Chem.* 382:621-628) e a uma temperatura superior a 50 °C. Deste modo, numa forma de realização, o referido catião é seleccionado do grupo consistindo de  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ ,  $\text{Rb}^+$ ,  $\text{NH}_4^+$ ,  $\text{Cs}^+$ ,  $\text{Li}^+$ ,  $\text{Sr}^{2+}$ ,  $\text{Ba}^{2+}$ ,  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Mn}^{2+}$ ,  $\text{Co}^{2+}$ ,  $\text{Ni}^{2+}$  e  $\text{Mg}^{2+}$ . Numa forma de realização preferida, o referido catião é seleccionado do grupo consistindo de  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ ,  $\text{NH}_4^+$ ,  $\text{Li}^+$ ,  $\text{Ca}^{2+}$  e  $\text{Mg}^{2+}$ , de um modo mais preferido, o referido catião é  $\text{Na}^+$  ou  $\text{K}^+$ , de um modo muito preferido, o referido catião é  $\text{Na}^+$ . Numa forma de realização muito preferida, a concentração

Numa forma de realização preferida, a solução II comprehendendo o referido oligonucleótido é obtida pela adição do referido catião à referida solução I, em que, de um modo

preferido, a referida adição é realizada após o referido ajustamento do pH da solução I.

Numa forma de realização adicional, a referida solução II é uma mistura de qualquer catião seleccionado do grupo consistindo de  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ ,  $\text{Rb}^+$ ,  $\text{NH}_4^+$ ,  $\text{Cs}^+$ ,  $\text{Li}^+$ ,  $\text{Sr}^{2+}$ ,  $\text{Ba}^{2+}$ ,  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Mn}^{2+}$ ,  $\text{Co}^{2+}$ ,  $\text{Ni}^{2+}$  e  $\text{Mg}^{2+}$ . Numa forma de realização adicional, a referida solução II é uma mistura de qualquer catião seleccionado do grupo consistindo de  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ ,  $\text{NH}_4^+$ ,  $\text{Li}^+$ ,  $\text{Ca}^{2+}$  e  $\text{Mg}^{2+}$ . Numa forma de realização muito preferida, a referida mistura compreende ou, de um modo preferido, consiste de  $\text{Na}^+$  e  $\text{K}^+$ .

Numa forma de realização preferida, a referida solução II compreende, pelo menos, 20 mM, de um modo preferido, pelo menos, 100 mM, de um modo mais preferido, 200 a 275 mM e, de um modo muito preferido, 250 mM do referido catião ou da referida mistura de catiões. Numa forma de realização muito preferida, a referida solução II compreende 250 mM de  $\text{Na}^+$  e  $\text{K}^+$ , de um modo muito preferido, 250 mM de  $\text{Na}^+$ . Numa forma de realização ainda mais preferida, a referida solução II compreende 250 mM de cloreto de sódio ou cloreto de potássio, de um modo muito preferido, 250 mM de cloreto de sódio. Contudo, qualquer sal de sódio, potássio, amónio, lítio, cálcio ou magnésio conhecido na técnica pode ser utilizado para este efeito.

Numa forma de realização adicional, a concentração do referido oligonucleótido na referida solução II é 50  $\mu\text{M}$  a 2 mM, de um modo preferido, 100 a 300  $\mu\text{M}$ , de um modo muito preferido, 175  $\mu\text{M}$ .

Numa forma de realização adicional, o referido processo compreende, ainda, o ajustamento da temperatura da solução II à temperatura III, em que a referida temperatura III é 50 a 99 °C, de um modo preferido, 80 a 90 °C, de um modo mais preferido, cerca de 85 °C e, de um modo muito preferido, 85 °C.

Numa forma de realização adicional, o referido processo compreende a incubação do referido oligonucleótido na solução II à temperatura III, em que a referida incubação é realizada até que o referido oligonucleótido compreenda um tempo de início do pico relativo de 50 a 110%, de um modo preferido, de 80 a 95%, de um modo mais preferido, de 80 a 90%, de um modo ainda mais preferido, de 83 a 90%, de um modo ainda mais preferido, de 85 a 90% e, de um modo muito preferido, de 88%. Numa forma de realização muito preferida, o referido oligonucleótido é G10 (SEQ ID Nº: 8) e a referida incubação é realizada até que o referido oligonucleótido compreenda um tempo de início do pico relativo de 50 a 110%, de um modo preferido, de 80 a 95%, de um modo mais preferido, de 80 a 90%, de um modo ainda mais preferido, de 83 a 90%, de um modo ainda mais preferido, de 85 a 90% e, de um modo muito preferido, de 88%.

O tempo de incubação requerido para se obter o oligonucleótido compreendendo o tempo de início do pico relativo desejado depende da sequência e da pureza do oligonucleótido e varia, tipicamente e, de um modo preferido, entre cerca de 5 min e cerca de 30 min. Numa forma de realização preferida, o referido oligonucleótido é G10 (SEQ ID Nº: 8) e a referida incubação do referido oligonucleótido na referida solução II à referida temperatura III é realizada durante 9 a 24 min.

O processo de agregação é terminado por arrefecimento da solução II abaixo de 50 °C. Numa forma de realização preferida, o referido processo compreende o ajustamento da temperatura da solução II à temperatura IV, em que a referida temperatura IV é inferior a 50 °C e em que, de um modo preferido, a referida temperatura IV é 0 a 25 °C, de um modo mais preferido, 0 a 10 °C e, de um modo muito preferido, 0 a 2 °C.

Verificou-se que as taxas de aquecimento e/ou arrefecimento aplicadas no processo da invenção têm impacto no rendimento e distribuição de tamanho de partícula do oligonucleótidio agregado obtido. Em particular, verificou-se que, no decurso do aumento de escala do processo para volumes de lotes mais elevados, o rendimento e distribuição de tamanho de partícula podem ser ainda melhorados pela utilização de rampas de temperatura (*i. e.*, taxas de aquecimento ou arrefecimento) de, pelo menos, 3,6 °C/min. O especialista pode alcançar uma rampa de temperatura definida, pela estandardização das condições de processo, em relação ao volume de reacção, geometria e condutividade de aquecimento do recipiente de reacção e à diferença de temperatura escolhida. Numa forma de realização preferida, o referido ajustamento da temperatura da solução I à temperatura I, o referido ajustamento da temperatura da referida solução I à temperatura II, o referido ajustamento da temperatura da solução II à temperatura III e/ou o referido ajustamento da temperatura da solução II à temperatura IV são realizados com uma rampa de temperatura de, pelo menos, 3,6 °C/min. Numa forma de realização preferida adicional, o referido ajustamento da temperatura da solução II à temperatura III é realizado com uma rampa de temperatura de, pelo menos, 3,6 °C/min, em que, de um modo preferido, a referida rampa de temperatura é cerca de 7 °C/min. Numa forma de

realização preferida adicional, o referido ajustamento da temperatura da solução II à temperatura IV é realizado com uma rampa de temperatura de, pelo menos, 3,6 °C/min, em que, de um modo preferido, a referida rampa de temperatura é cerca de 7 °C/min.

De modo a ser capaz de formar agregados, o referido oligonucleótido comprehende, pelo menos, uma, de um modo preferido, duas extensões de poli G. Numa forma de realização preferida, o referido oligonucleótido comprehende na sua extremidade 5', pelo menos, 3, de um modo preferido, pelo menos, 4 entidades de guanosina e na sua extremidade 3', pelo menos, 3, de um modo preferido, pelo menos, 4 entidades de guanosina. Numa forma de realização preferida adicional, o referido oligonucleótido comprehende na sua extremidade 5', pelo menos, 4 entidades de guanosina e na sua extremidade 3', pelo menos, 4 entidades de guanosina. Numa forma de realização preferida, o referido oligonucleótido comprehende na sua extremidade 5', pelo menos, 3 e, no máximo, 20, de um modo preferido, no máximo, 15 entidades de guanosina e na sua extremidade 3', pelo menos, 3 e, no máximo, 20, de um modo preferido, no máximo, 15 entidades de guanosina. Numa forma de realização preferida adicional, o referido oligonucleótido comprehende na sua extremidade 5', pelo menos, 3, de um modo preferido, pelo menos, 4 e, no máximo, 11 entidades de guanosina e na sua extremidade 3', pelo menos, 3, de um modo preferido, pelo menos, 4 e, no máximo, 10 entidades de guanosina. Numa forma de realização preferida adicional, o referido oligonucleótido e um oligonucleótido contendo CpG não metilado, de um modo preferido, de que o referido oligonucleótido contendo CpG não metilado comprehende duas extensões de poli G, em que, de um modo preferido, cada das referidas extensões de poli G consiste de,

pelo menos, 4 entidades de guanosina e em que, de um modo preferido, adicional, o referido oligonucleótido contendo CpG não metilado compreende uma sequência palindrómica, em que a referida sequência palindrómica está localizada entre as referidas extensões de poli G. Numa forma de realização preferida adicional, o referido oligonucleótido compreende na extremidade 5', pelo menos, 3, de um modo preferido, pelo menos, 4 entidades de guanosina e na sua extremidade 3', pelo menos, 3, de um modo preferido, pelo menos, 4 entidades de guanosina, em que o referido oligonucleótido compreende, ainda, uma sequência palindrómica, em que, de um modo preferido, a referida sequência palindrómica é GACGATCGTC (SEQ ID N°: 1).

Numa forma de realização preferida adicional, o referido oligonucleótido compreende uma sequência palindrómica, em que, de um modo preferido, a referida sequência palindrómica é GACGATCGTC (SEQ ID N°: 1) e em que a referida sequência palindrómica está flanqueada na sua extremidade 5' por, pelo menos, 3, de um modo preferido, pelo menos, 4 e, no máximo, 1 entidade de guanosina e em que a referida sequência palindrómica está flanqueada na sua extremidade 3' por, pelo menos, 3, de um modo preferido, pelo menos, 4 e, no máximo, 15 entidades de guanosina.

Numa forma de realização preferida adicional, o referido oligonucleótido compreende 10 a 1000 nucleótidos, de um modo preferido, 10 a 200 nucleótidos, de um modo mais preferido, 10 a 100 nucleótidos, de um modo ainda mais preferido, 20 a 40 nucleótidos, de um modo muito preferido, 30 nucleótidos.

Numa forma de realização muito preferida, o referido oligonucleótido compreende ou, de um modo preferido, consiste

numa sequência de ácidos nucleicos seleccionada do grupo consistindo de: (a) "G4-4"GGGGGACGAT CGTCGGGG (SEQ ID N°: 2); (b) "G5-5" GGGGGGACGA TCGTCGGGG (SEQ ID N°: 3); (c) "G6-6"GGGGGGGACG ATCGTCGGGG GG (SEQ ID N°: 4); (d) "G7-7" GGGGGGGGAC GATCGTCGGG GGGG (SEQ ID N°: 5); (e)"G8-8" GGGGGGGGGA CGATCGTCGG GGGGGG (SEQ ID N°: 6); (f)"G9-9" GGGGGGGGGG ACGATCGTCG GGGGGGGG (SEQ ID N°: 7); (g) "G10" GGGGGGGGGG GACGATCGT CGGGGGGGGG GG (SEQ ID N°: 8), em que, de um modo preferido, o referido oligonucleótido consiste integralmente de nucleótidos ligados por fosfodiéster. Numa forma de realização ainda mais preferida, o referido oligonucleótido comprehende ou, de um modo preferido, consiste na sequência de ácidos nucleicos "G10" GGGGGGGGGGACGATCGTCGGGGGGGGGG (SEQ ID N°: 8), em que, de um modo preferido, o referido oligonucleótido consiste integralmente de nucleótidos ligados por fosfodiéster.

A divulgação refere-se, ainda, a uma composição nucleotídica comprehendendo um oligonucleótido, em que a referida composição nucleotídica é obtenível por qualquer um dos processos descritos acima, implementando qualquer uma das formas de realização descritas acima, isoladamente ou em qualquer combinação. Em particular, a invenção refere-se a uma composição nucleotídica comprehendendo um oligonucleótido, em que a referida composição nucleotídica é obtenível por qualquer um dos processos descritos acima, em que, de um modo preferido, o referido oligonucleótido comprehende um tempo de inicio do pico relativo de 50 a 110%, de um modo preferido, de 80 a 95%, de um modo mais preferido, de 80 a 90%, de um modo ainda mais preferido, de 83 a 90%, de um modo ainda mais preferido, de 85 a 90% e, de um modo muito preferido, de 88%. Numa forma de realização preferida, a referida composição nucleotídica

compreende um oligonucleótido, em que o referido oligonucleótido compreende ou, de um modo preferido, consiste numa sequência de ácidos nucleicos seleccionada do grupo consistindo de: (a) "G4-4"GGGGGACGAT CGTCGGGG (SEQ ID N°: 2); (b) "G5-5" GGGGGGACGA TCGTCGGGG (SEQ ID N°: 3); (c) "G6-6"GGGGGGGACG ATCGTCGGGG GG (SEQ ID N°: 4); (d) "G7-7" GGGGGGGGAC GATCGTCGGG GGGG (SEQ ID N°: 5); (e) "G8-8" GGGGGGGGGA CGATCGTCGG GGGGGG (SEQ ID N°: 6); (f) "G9-9" GGGGGGGGGG ACGATCGTC GGGGGGGG (SEQ ID N°: 7); (g) "G10" GGGGGGGGGG GACGATCGT CGGGGGGGGG GG (SEQ ID N°: 8); (h) "G11" GGGGGGGGGG GGACGATCGT CGGGGGGGGG GG (SEQ ID N°: 9), em que, de um modo preferido, o referido oligonucleótido consiste integralmente de nucleótidos ligados por fosfodiéster. Numa forma de realização ainda mais preferida, a referida composição nucleotídica compreende um oligonucleótido, em que o referido oligonucleótido compreende ou, de um modo preferido, consiste na sequência de ácidos nucleicos "G10" GGGGGGGGGGACGATCGTCGGGGGGGG (SEQ ID N°: 8), em que o referido oligonucleótido consiste integralmente de nucleótidos ligados por fosfodiéster e em que o referido oligonucleótido compreende um tempo de início do pico relativo de 50 a 110%, de um modo preferido, de 80 a 95%, de um modo mais preferido, de 80 a 90%, de um modo ainda mais preferido, de 83 a 90%, de um modo ainda mais preferido, de 85 a 90% e, de um modo muito preferido, de 88%.

Como mencionado antes, as composições nucleotídicas são úteis num processo para a produção de uma composição compreendendo (i) uma partícula semelhante a vírus, em que a referida partícula semelhante a vírus é uma partícula semelhante a vírus de um bacteriófago de ARN e (ii) um oligonucleótido, em que o referido oligonucleótido está empacotado na referida partícula semelhante a vírus, porque o oligonucleótido agregado, como contido nas composições nucleotídicas da invenção, facilita o auto-agrupamento da proteína de revestimento de bacteriófagos de ARN e, deste modo, a formação de partículas semelhantes a vírus de bacteriófagos de ARN, em que o referido oligonucleótido está empacotado nas referidas partículas semelhantes a vírus. Por conseguinte, a invenção refere-se, ainda, a um processo para a produção de uma composição compreendendo (i) uma partícula semelhante a vírus, em que a referida partícula semelhante a vírus é uma partícula semelhante a vírus de um bacteriófago de ARN e (ii) um oligonucleótido, em que o referido oligonucleótido está empacotado na referida partícula semelhante a vírus, o referido processo compreendendo as etapas de: (a) proporcionar proteína de revestimento do referido bacteriófago de ARN; (b) proporcionar uma composição nucleotídica compreendendo um oligonucleótido, em que a referida composição nucleotídica é uma composição nucleotídica obtenível por qualquer um dos processos da invenção; (c) produção de uma mistura, em que a referida mistura comprehende: (i) a referida proteína de revestimento; (ii) um agente capaz de prevenir o auto-agrupamento da referida proteína de revestimento; (iii) o referido oligonucleótido; (d) remoção do referido agente da referida mistura; e (e) permitir que a referida proteína de revestimento se auto-agruppe numa partícula semelhante a vírus. O referido processo pode compreender qualquer uma das características e formas de realização aqui descritas em qualquer combinação.

O oligonucleótido compreendendo um tempo de início do pico relativo de 50 a 110% é muito útil para os efeitos da invenção, enquanto que o oligonucleótido compreendendo um tempo de início do pico relativo superior ou inferior pode resultar em rendimento baixo. Deste modo, a invenção proporciona, ainda, um processo para a produção de uma composição compreendendo (i) uma partícula semelhante a vírus, em que a referida partícula semelhante a vírus é uma partícula semelhante a vírus de um bacteriófago de ARN e (ii) um oligonucleótido, em que o referido oligonucleótido está empacotado na referida partícula semelhante a vírus, o referido processo compreendendo as etapas de: (a) proporcionar proteína de revestimento do referido bacteriófago de ARN; (b) proporcionar um oligonucleótido, (i) em que o referido oligonucleótido compreende, de um modo preferido, pelo menos, uma extensão de poli G; e (ii) em que o referido oligonucleótido compreende um tempo de início do pico relativo de 50 a 110%; (c) produção de uma mistura, em que a referida mistura compreende: (i) a referida proteína de revestimento; (ii) um agente capaz de prevenir o auto-agrupamento da referida proteína de revestimento; (iii) o referido oligonucleótido; (d) remoção do referido agente da referida mistura; e (e) permitir que a referida proteína de revestimento se auto-agrupe numa partícula semelhante a vírus. O referido processo pode compreender qualquer uma das características e formas de realização aqui descritas em qualquer combinação.

O especialista é capaz de produzir e purificar a proteína de revestimento de bacteriófagos de ARN por purificação da referida proteína de revestimento de bacteriófagos de ARN, pela aplicação de métodos correntes. Contudo, numa forma de realização preferida, a referida proteína de revestimento é produzida de modo recombinante, de um modo preferido, por

expressão da referida proteína de revestimento em *E. coli*. Os métodos para a obtenção de proteína de revestimento de bacteriófagos de ARN são divulgados na secção de Exemplos. Numa forma de realização preferida, a referida proteína de revestimento comprehende ou, alternativamente, consiste essencialmente, ou alternativamente consiste de proteínas recombinantes, ou seus fragmentos, de um bacteriófago de ARN, em que, de um modo preferido, o referido bacteriófago de ARN é seleccionado do grupo consistindo de: (a) bacteriófago Q $\beta$ ; (b) bacteriófago R17; (c) bacteriófago fr; (d) bacteriófago GA; (e) bacteriófago SP; (f) bacteriófago MS2; (g) bacteriófago M11; (h) bacteriófago MX1; (i) bacteriófago NL95; (j) bacteriófago f2; (k) bacteriófago PP7; e bacteriófago AP205. Numa forma de realização preferida, o referido bacteriófago de ARN é o bacteriófago Q $\beta$ . Os processos e métodos para a expressão e purificação de partículas semelhantes a vírus de bacteriófagos de ARN, em particular de bacteriófago Q $\beta$ , são divulgados nos documentos WO2006/125821A2 e WO2007/039552A1, os quais são aqui incorporados a título de referência. A proteína de revestimento do bacteriófago de ARN pode ser obtida por desagrupamento de partículas semelhantes a vírus, e. g., como aqui descrito nos Exemplos.

Numa forma de realização preferida adicional, o referido bacteriófago de ARN é o bacteriófago AP205. As formas mutantes competentes para agrupamento das VLP de AP205, incluindo a proteína de revestimento de AP205 com a substituição de prolina no aminoácido 5 em treonina, também podem ser utilizadas na prática da invenção. O documento WO 2004/007538 descreve, em particular no Exemplo 1 e Exemplo 2, como se obter VLP compreendendo proteínas de revestimento de AP205 e, por este

meio, em particular, a sua expressão e purificação. O documento WO 2004/007538 é aqui incorporado a título de referência.

Numa forma de realização preferida adicional, o referido bacteriófago de ARN é o bacteriófago fr. A proteína de revestimento de fr na forma de VLP recombinante pode ser obtida como descrito por Pushko P et al. ((1993) *Prot Engin* 6:883-891). Numa forma de realização preferida adicional, o referido bacteriófago de ARN é o bacteriófago GA. A VLP de GA pode ser obtida pela clonagem de ADNC de proteína de revestimento de GA, isolado por transcrição reversa do fago GA em pQb185 que é descrito, por exemplo, no documento WO2004/007538. O desagrupamento das VLP de Fr e GA pode ser facilmente feito pela incubação das VLP em ureia a 7 M, opcionalmente suplementada com ácido acético a uma concentração de 0,1 M. O ácido nucleico é, ainda, purificado da proteína de revestimento por cromatografia de permuta iônica, a um pH onde uma quantidade significativa da proteína de revestimento escoa enquanto o ácido nucleico é retido, ou a um pH onde a proteína de revestimento também é adsorvida na coluna e, subsequentemente, eluída com um gradiente salino.

Numa forma de realização preferida, a referida proteína de revestimento comprehende ou, de um modo preferido, consiste numa sequênciade aminoácidos seleccionada do grupo consistindo de:  
(a) SEQ ID Nº: 10 (Q $\beta$  CP); (b) uma mistura de SEQ ID Nº: 10 e SEQ ID Nº: 11 (proteína A1 de Q $\beta$ ); (c) SEQ ID Nº: 12 (proteína de revestimento de R17); (d) SEQ ID Nº: 13 (proteína de revestimento de fr); (e) SEQ ID Nº: 14 (proteína de revestimento de GA); (f) SEQ ID Nº: 15 (proteína de revestimento de SP); (g) uma mistura de SEQ ID Nº: 15 e SEQ ID Nº: 16; (h) SEQ ID Nº: 17 (proteína de revestimento de MS2);

(i) SEQ ID N°: 18 (proteína de revestimento de M11);  
(j) SEQ ID N°: 19 (proteína de revestimento de MX1);  
(k) SEQ ID N°: 20 (proteína de revestimento de NL95);  
(l) SEQ ID N°: 21 (proteína de revestimento de f2);  
(m) SEQ ID N°: 22 (proteína de revestimento de PP7); e  
(n) SEQ ID N°: 23 (proteína de revestimento de AP205). Numa forma de realização preferida adicional, a referida proteína de revestimento comprehende ou, de um modo preferido, consiste numa sequência de aminoácidos seleccionada do grupo consistindo de:  
(a) SEQ ID N°: 10; (b) uma mistura de SEQ ID N°: 11 e SEQ ID N°: 11; (c) SEQ ID N°: 13; (d) SEQ ID N°: 14; (e) SEQ ID N°: 23. Numa forma de realização muito preferida adicional, a referida proteína de revestimento da referida proteína de revestimento comprehende ou, de um modo preferido, consiste numa sequência de aminoácidos seleccionada do grupo consistindo de: (a) SEQ ID N°: 10; e (b) uma mistura de SEQ ID N°: 10 e SEQ ID N°: 11.

Além disso, a proteína de revestimento mutante do bacteriófago Q $\beta$ , em que os resíduos de lisina expostos estão substituídos por argininas, pode ser utilizada para a presente invenção. Deste modo, numa forma de realização preferida adicional, a referida proteína de revestimento comprehende, consiste essencialmente ou, alternativamente, consiste de proteínas de revestimento de Q $\beta$  mutantes, como divulgado no documento WO02/056905 (cf. o Exemplo 18 neste).

Além disso, também se mostrou que as proteínas de revestimento de bacteriófago de ARN se auto-agrupam após expressão num hospedeiro bacteriano (Kastelein, RA. et al., *Gene* 23:245-254 (1983), Kozlovskaya, TM. et al., *Dokl. Akad. Nauk SSSR* 287:452-455 (1986), Adhin, MR. et al., *Virology* 170:238-242

(1989), Priano, C. et al., *J. Mol. Biol.* 249:283-297 (1995)). Em particular, as propriedades biológicas e bioquímicas de GA (Ni, CZ., et al., *Protein Sci.* 5:2485-2493 (1996), Tars, K et al., *J. Mol.Biol.* 271:759-773(1997)) e de fr (Pushko P. et al., *Prot. Eng.* 6:883-891 (1993), Liljas, L et al. *J Mol. Biol.* 244:279-290, (1994)) foram divulgadas. A estrutura cristalina de vários bacteriófagos de ARN foi determinada (Golmohammadi, R. et al., *Structure* 4:543-554 (1996)).

Tipicamente e, de um modo preferido, os processos aqui divulgados para a produção de uma composição compreendendo (i) uma partícula semelhante a vírus, em que a referida partícula semelhante a vírus é uma partícula semelhante a vírus de um bacteriófago de ARN e (ii) um oligonucleótido, em que o referido oligonucleótido está empacotado na referida partícula semelhante a vírus, são efectuados à temperatura ambiente. Numa forma de realização preferida, os referidos processos são realizados a 15 a 30 °C, de um modo preferido, a 19 a 25 °C, de um modo muito preferido, a 22 °C. Numa forma de realização preferida adicional, a referida produção da referida mistura, referida remoção do referido agente da referida mistura e/ou referido permitir que a referida proteína de revestimento se auto-agruppe numa partícula semelhante a vírus são realizados a 15 a 30 °C, de um modo preferido, a 19 a 25 °C, de um modo muito preferido, a 22 °C.

O referido processo compreende a produção de uma mistura, em que a referida mistura compreende: (i) a referida proteína de revestimento; (ii) um agente capaz de prevenir o auto-agrupamento da referida proteína de revestimento; (iii) o referido oligonucleótido. Numa forma de realização preferida, a concentração da referida proteína de revestimento na referida

mistura é 0,5 a 10 mg/mL, de um modo preferido, 1 a 4 mg/mL e, de um modo muito preferido, 2,5 mg/mL, em que, de um modo preferido, a referida concentração é determinada num ensaio de Bradford. Numa forma de realização preferida adicional, a concentração do referido oligonucleótido na referida mistura é 12,5 a 250 µM, de um modo mais preferido, 25 a 100 µM e, de um modo muito preferido, 62,5 µM.

De modo a obter-se um rendimento óptimo do processo de empacotamento, a razão molar do referido oligonucleótido e da referida proteína de revestimento na referida mistura é 0,5 a 1,2, de um modo preferido, 0,6 a 0,8 e, de um modo muito preferido, 0,7. A utilização de menos oligonucleótido por proteína de revestimento irá conduzir a rendimento baixo, enquanto a utilização de um exagero excessivo de oligonucleótido aumenta os custos e pode resultar num produto com baixa pureza. Numa forma de realização muito preferida, a concentração da referida proteína de revestimento na referida mistura é 2,5 mg/mL e a concentração do referido oligonucleótido na referida mistura é 62,5 µM.

As proteínas de revestimento de vírus e, em particular, de bacteriófagos de ARN têm, em geral, uma forte tendência a auto-agrupamento numa estrutura de cápside, e.g., numa partícula semelhante a vírus. Embora não em todos os casos, esta tendência é, em muitos casos, melhorada na presença de ácidos nucleicos, tais como ARN ou ADN. De modo a obter-se mistura óptima da referida proteína de revestimento e referido oligonucleótido, antes que ocorra o auto-agrupamento da referida proteína de revestimento, a referida mistura compreende um agente capaz de prevenir o auto-agrupamento da referida proteína de revestimento. Tipicamente e, de um modo preferido, o referido

agente compreende um composto desnaturante. Numerosos compostos desnaturantes são conhecidos na Bioquímica e incluem detergentes, ureia ou cloridrato de guanidínio. Os detergentes preferidos são dodecilsulfato de sódio, Tween 20, TritonX 100 e semelhantes. Numa forma de realização preferida, o referido composto desnaturante é ureia ou cloridrato de guanidínio, em que, de um modo preferido, a concentração do referido composto desnaturante, de um modo preferido, da referida ureia, na referida mistura é 0,25 a 7,2 M, de um modo preferido, 1 M. Numa forma de realização muito preferida, o referido composto desnaturante é ureia e a concentração da referida ureia na referida mistura é 0,5 a 2 M, de um modo preferido, 0,7 a 1,5 M, de um modo mais preferido, 0,8 a 1,2 M e, de um modo muito preferido, 1 M.

Numa forma de realização preferida, o pH da referida mistura é cerca de neutro, de um modo preferido, o referido pH é 6 a 8, de um modo mais preferido, 6,8 a 7,5 e, de um modo muito preferido, o referido pH é 7,2. Numa forma de realização muito preferida, a referida mistura compreende um tampão de fosfatos, de um modo preferido, um tampão de fosfato de sódio, em que, de um modo preferido, adicional, a concentração final do referido tampão de fosfatos na referida mistura é 2 a 100 mM, de um modo mais preferido, 10 a 50 mM e, de um modo muito preferido, cerca de 20 mM.

Numa forma de realização adicional, a referida mistura compreende, ainda, sal, em que, de um modo preferido, o referido sal é um halogeneto, de um modo preferido, um cloreto de um metal alcalino, de um modo mais preferido, o referido sal é cloreto de potássio ou cloreto de sódio ou uma sua combinação e, de um modo muito preferido, o referido sal é cloreto de sódio.

Numa forma de realização preferida, a concentração do referido sal ou referida combinação de sais, de um modo preferido, a concentração do referido cloreto de sódio, na referida mistura é 0 a 1 M, de um modo preferido, 0 a 550 mM, de um modo mais preferido, 0 a 350 mM, de um modo ainda mais preferido, 50 a 350 mM e, de um modo muito preferido, 250 mM.

A cápside e/ou partículas semelhantes a vírus de determinados bacteriófagos de ARN, em particular de bacteriófago Q $\beta$ , bacteriófago AP205 e bacteriófago fr, são estabilizadas por ligações persulfureto intermoleculares entre as subunidades de proteína formando a referida cápside ou partícula semelhante a vírus. A adição de um agente de redução à referida mistura mantém as referidas pontes persulfureto num estado reduzido e, deste modo, suporta a prevenção do auto-agrupamento da referida proteína de revestimento. Numa forma de realização preferida, o referido agente, por conseguinte, compreende, ainda, um agente de redução, em que o referido agente de redução é, de um modo preferido, seleccionado de DTT (ditioeritol),  $\beta$ -mecaptoetanol, TCEP e outros agentes de redução em geral conhecidos na técnica. Numa forma de realização preferida, o referido agente de redução é DTT, em que, de um modo preferido, a concentração do referido DTT na referida mistura é 1 a 25 mM, de um modo preferido, 2,5 mM. Numa forma de realização muito preferida, o referido bacteriófago de ARN é bacteriófago Q $\beta$ , bacteriófago AP205 ou bacteriófago fr e o referido agente compreende, ainda, um agente de redução, em que, de um modo preferido, o referido agente de redução é DTT e em que, de um modo preferido, adicional, a concentração do referido DTT na referida mistura é 1 a 25 mM, de um modo preferido, 2,5 mM. Numa forma de realização preferida adicional, a referida proteína de revestimento compreende resíduos de cisteína capazes de formarem ligações persulfureto

intermoleculares na referida partícula semelhante a vírus e o referido agente compreende, ainda, um agente de redução, em que, de um modo preferido, o referido agente de redução é DTT e em que, de um modo preferido, adicional, a concentração do referido DTT na referida mistura é 1 a 25 mM, de um modo preferido, 2,5 mM.

Numa forma de realização preferida, a referida produção da referida mistura compreende adicionar (i) a referida proteína de revestimento; (ii) o referido agente capaz de prevenir o auto-agrupamento da referida proteína de revestimento; e (iii) o referido oligonucleótido à referida mistura, em que, de um modo preferido, a referida adição é realizada na ordem dada e em que, de um modo preferido, adicional, a referida mistura é misturada antes da referida adição do referido oligonucleótido.

Numa forma de realização preferida adicional, o referido processo compreende, ainda, a etapa de incubação da referida mistura antes da referida remoção do referido agente, em que, de um modo preferido, a referida incubação é realizada durante cerca de 50 a 70, de um modo preferido, cerca de 60 min. Numa forma de realização preferida adicional, a incubação da referida mistura é realizada a 15 a 30 °C, de um modo mais preferido, a 19 a 25 °C e, de um modo muito preferido, a 22 °C. Numa forma de realização preferida adicional, a referida incubação da referida mistura compreende a agitação da referida mistura, em que, de um modo preferido, a referida agitação é realizada a cerca de 50 a 200 rpm, de um modo muito preferido, a cerca de 100 rpm. Numa forma de realização muito preferida, a referida incubação da referida mistura é realizada durante cerca de 60 min e a referida incubação da referida mistura compreende a agitação da

referida mistura, em que, de um modo preferido, a referida agitação é realizada a cerca de 100 rpm.

Numa forma de realização, a referida remoção do referido agente da referida mistura é realizada por uma primeira troca de tampão com um primeiro tampão, em que, de um modo preferido, a referida primeira troca de tampão é realizada por diálise ou por filtração de caudal contínuo, de um modo preferido, por filtração de caudal contínuo. A referida primeira troca de tampão é realizada através de uma membrana compreendendo uma redução de peso molecular o qual permite a retenção da referida proteína de revestimento e da VLP auto-agrupada. Numa forma de realização preferida, a referida primeira troca de tampão é realizada numa membrana, em que a referida membrana compreende uma redução de peso molecular de 1 a 50 kD, de um modo preferido, de 5 a 30 kD, de um modo muito preferido, de 30 kD. Numa forma de realização muito preferida, a referida primeira troca de tampão é realizada por filtração de caudal contínuo através de uma membrana compreendendo uma redução de peso molecular de 1 a 50 kD, de um modo preferido, de 30 kD, em que, de um modo preferido, adicional, o volume do referido primeiro tampão é cerca de 6 vezes o volume da mistura referida. Numa forma de realização muito preferida, a referida membrana é a Biomax-5 (PES), compreendendo uma redução de peso molecular de 30 kD. Numa forma de realização muito preferida, a referida primeira troca de tampão é realizada por filtração de caudal contínuo através de uma membrana compreendendo uma redução de peso molecular de 1 a 50 kD, de um modo preferido, de 30 kD, em que o caudal de permeado é ajustado para cerca de 96 L/(m<sup>2</sup>\*h).

Numa forma de realização preferida adicional, o referido primeiro tampão compreende um sal, em que, de um modo preferido,

a composição de sal do referido primeiro tampão é idêntica à composição de sal da referida mistura. Numa forma de realização preferida, o referido sal no referido primeiro tampão é um halogeneto, de um modo preferido, um cloreto de um metal alcalino, de um modo mais preferido, o referido sal é cloreto de potássio ou cloreto de sódio ou uma sua combinação e, de um modo muito preferido, o referido sal é cloreto de sódio. Numa forma de realização preferida, a concentração do referido sal ou referida combinação de sais, de um modo preferido, a concentração do referido cloreto de sódio, no referido primeiro tampão é 0 a 1 M, de um modo preferido, 0 a 550 mM, de um modo mais preferido, 0 a 350 mM, de um modo ainda mais preferido, 50 a 350 mM e, de um modo muito preferido, 250 mM. Numa forma de realização preferida adicional, o pH do referido primeiro tampão 6 a 8, de um modo mais preferido, 6,8 a 7,5 e, de um modo muito preferido, o referido pH é 7,2. Numa forma de realização preferida adicional, o referido primeiro tampão comprehende um tampão de fosfatos, de um modo preferido, um tampão de fosfato de sódio, em que, de um modo preferido, adicional, a concentração final do referido tampão de fosfatos no referido primeiro tampão é 2 a 100 mM, de um modo mais preferido, 10 a 50 mM e, de um modo muito preferido, cerca de 20 mM.

De modo a estabilizar a referida partícula semelhante a vírus formada na reacção de auto-agrupamento, a referida partícula semelhante a vírus é, de um modo preferido, colocada em contacto com um agente de oxidação capaz de formar ligações persulfureto intermoleculares na referida partícula semelhante a vírus. Deste modo, numa forma de realização preferida, o referido processo comprehende, ainda, a etapa de colocar a referida partícula semelhante a vírus em contacto com um agente de oxidação, em que, de um modo preferido, o referido agente de

oxidação é seleccionado do grupo consistindo de (a) peróxido de hidrogénio, em que, de um modo preferido, a concentração do referido peróxido de hidrogénio é 0,25-50 mM, de um modo preferido, 2 mM; (b) oxigénio; (c) glutationo; (d) ascorbato; (e) Cu<sup>2+</sup>; e (f) Fe<sup>3+</sup>. Numa forma de realização muito preferida, o referido bacteriófago de ARN é bacteriófago Qβ, bacteriófago AP205 ou bacteriófago fr e o referido processo comprehende, ainda, a etapa de colocar a referida partícula semelhante a vírus em contacto com um agente de oxidação, em que, de um modo preferido, o referido agente de oxidação é seleccionado do grupo consistindo de (a) peróxido de hidrogénio, em que, de um modo preferido, a concentração do referido peróxido de hidrogénio é 0,25-50 mM, de um modo preferido, 2 mM; (b) oxigénio; (c) glutationo; (d) Cu<sup>2+</sup>; e (e) Fe<sup>3+</sup> e em que, de um modo muito preferido, o referido agente de oxidação é peróxido de hidrogénio, em que, de um modo preferido, adicional, a concentração do referido peróxido de hidrogénio é 0,25-50 mM, de um modo preferido, 2 mM. Numa forma de realização preferida, a referida proteína de revestimento comprehende resíduos de cisteína capazes de formarem ligações persulfureto intermoleculares na referida partícula semelhante a vírus, em que, de um modo preferido, a referida proteína de revestimento é proteína de revestimento de bacteriófago Qβ, bacteriófago AP205 ou bacteriófago fr e o referido processo comprehende, ainda, a etapa de colocar a referida partícula semelhante a vírus em contacto com um agente de oxidação, em que, de um modo preferido, o referido agente de oxidação é seleccionado do grupo consistindo de (a) peróxido de hidrogénio, em que, de um modo preferido, a concentração do referido peróxido de hidrogénio é 0,25-50 mM, de um modo preferido, 2 mM; (b) oxigénio; (c) glutationo; (d) Cu<sup>2+</sup>; e (e) Fe<sup>3+</sup> e em que, de um modo muito preferido, o referido agente de oxidação é peróxido de

hidrogénio, em que, de um modo preferido, adicional, a concentração do referido peróxido de hidrogénio é 0,25-50 mM, de um modo preferido, 2 mM.

Numa forma de realização preferida adicional, o referido processo comprehende, ainda, a etapa de purificação da referida partícula semelhante a vírus, em que, de um modo preferido, a referida purificação comprehende uma segunda troca de tampão com um segundo tampão, em que, de um modo preferido, adicional, o referido segundo tampão é um tampão farmaceuticamente aceitável. Numa forma de realização preferida, a referida segunda troca de tampão é realizada com um segundo tampão, em que, de um modo preferido, a referida segunda troca de tampão é realizada por diálise ou por filtração de caudal contínuo, de um modo preferido, por filtração de caudal contínuo. A referida segunda troca de tampão é realizada através de uma membrana comprehendendo uma redução de peso molecular que permite a retenção da referida partícula semelhante a vírus e que, de um modo preferido, permite a permeação da referida proteína de revestimento e/ou do referido oligonucleótido. Deste modo, numa forma de realização preferida, a referida segunda troca de tampão é realizado através de uma membrana comprehendendo uma redução de peso molecular de 100 a 1000 kD, de um modo preferido, de 300 kD, em que, de um modo preferido, a referida segunda troca de tampão é realizada por filtração de caudal contínuo. Numa forma de realização muito preferida, a referida membrana é a PLCMK-300, comprehendendo uma redução de peso molecular de 300 kD. Numa forma de realização muito preferida adicional, a referida segunda troca de tampão é realizada por filtração de caudal contínuo através de uma membrana comprehendendo uma redução de peso molecular de 100 a 1000 kD, de um modo preferido, de 300 kD, em que, de um modo preferido,

cerca de 10 vezes do volume da referida mistura são trocados e em que, de um modo preferido, adicional, o caudal de permeado é ajustado para cerca de 100 L/(m<sup>2</sup>\*h).

Numa forma de realização adicional, o referido processo compreende a concentração da referida partícula semelhante a vírus, em que, de um modo preferido, a referida concentração é realizada para uma concentração final da referida partícula semelhante a vírus na referida composição de 1 a 5 mg de proteína/mL, de um modo preferido, de cerca de 2,5 mg de proteína/mL, em que, de um modo preferido, a referida concentração é determinada pelo ensaio de proteína de Bradford e em que, de um modo preferido, adicional, a referida partícula semelhante a vírus é dissolvida no referido segundo tampão. Numa forma de realização muito preferida, a referida concentração é realizada através de uma membrana capaz de reter a referida partícula semelhante a vírus, em que, de um modo preferido, o corte de peso molecular da referida membrana é 100 a 1000 kD, de um modo preferido, cerca de 300 kD e em que, de um modo preferido, adicional, a referida concentração é realizada com um caudal de permeado através da referida membrana inferior a 100 L/(h\*m<sup>2</sup>), de um modo preferido, cerca de 30 L/(h\*m<sup>2</sup>). Caudais baixos durante a etapa de concentração previnem a precipitação do produto.

Numa forma de realização preferida adicional, o referido processo compreende, ainda, a etapa de filtração estéril da referida partícula semelhante a vírus, em que, de um modo preferido, a referida partícula semelhante a vírus está contida no referido segundo tampão, em que, de um modo preferido, adicional, a referida filtração estéril é realizada através de

um filtro de membrana compreendendo 0,1 a 0,45 µm, de um modo preferido, cerca de 0,22 µm.

Numa forma de realização preferida adicional, os processos de acordo com a invenção para a produção de uma composição compreendendo (i) uma partícula semelhante a vírus, em que a referida partícula semelhante a vírus é uma partícula semelhante a vírus de um bacteriófago de ARN e (ii) um oligonucleotídeo, em que o referido oligonucleotídeo está empacotado na referida partícula semelhante a vírus, compreendem um rendimento de proteína, em que o referido rendimento de proteína é, pelo menos, 50%, de um modo preferido, pelo menos, 60%, de um modo mais preferido, pelo menos, 70%, de um modo ainda mais preferido, pelo menos, 75% e, de um modo muito preferido, pelo menos, 80%.

Numa forma de realização preferida adicional, os processos de acordo com a invenção para a produção de uma composição compreendendo (i) uma partícula semelhante a vírus, em que a referida partícula semelhante a vírus é uma partícula semelhante a vírus de um bacteriófago de ARN e (ii) um oligonucleotídeo, em que o referido oligonucleotídeo está empacotado na referida partícula semelhante a vírus, compreendem um rendimento de oligonucleotídeo, em que o referido rendimento de oligonucleotídeo é, pelo menos, 50%, de um modo preferido, pelo menos, 60%, de um modo mais preferido, pelo menos, 70%, de um modo ainda mais preferido, pelo menos, 75% e, de um modo muito preferido, pelo menos, 80%.

Numa forma de realização preferida adicional, a referida composição compreendendo a referida partícula semelhante a vírus compreende uma pureza de, pelo menos, 80%, de um modo preferido,

pelo menos, 90%, de um modo mais preferido, pelo menos, 95%, de um modo ainda mais preferido, pelo menos, 98% e, de um modo muito preferido, pelo menos, 99%.

Numa forma de realização preferida adicional, os processos de acordo com a invenção para a produção de uma composição compreendendo (i) uma partícula semelhante a vírus, em que a referida partícula semelhante a vírus é uma partícula semelhante a vírus de um bacteriófago de ARN e (ii) um oligonucleotídeo, em que o referido oligonucleotídeo está empacotado na referida partícula semelhante a vírus, compreendem um rendimento de oligonucleotídeo, em que o referido rendimento de oligonucleotídeo é, pelo menos, 50%, de um modo preferido, pelo menos, 60%, de um modo mais preferido, pelo menos, 70%, de um modo ainda mais preferido, pelo menos, 75% e, de um modo muito preferido, pelo menos, 80%.

Numa forma de realização preferida adicional, os processos de acordo com a invenção para a produção de uma composição compreendendo (i) uma partícula semelhante a vírus, em que a referida partícula semelhante a vírus é uma partícula semelhante a vírus de um bacteriófago de ARN e (ii) um oligonucleotídeo, em que o referido oligonucleotídeo está empacotado na referida partícula semelhante a vírus, compreendem um rendimento de proteína e um rendimento de oligonucleotídeo, em que o referido rendimento de proteína é, pelo menos, 50%, de um modo preferido, pelo menos, 60%, de um modo mais preferido, pelo menos, 70%, de um modo ainda mais preferido, pelo menos, 75% e, de um modo muito preferido, pelo menos, 80%.

Numa forma de realização preferida adicional, a referida composição compreendendo a referida partícula semelhante a vírus

compreende 15 a 30 µg, de um modo preferido, 20 a 25 µg e, de um modo muito preferido, cerca de 20 µg do referido oligonucleótido por 100 µg de proteína de revestimento, em que, de um modo preferido, a referida partícula semelhante a vírus é uma partícula semelhante a vírus de bacteriófago Q $\beta$  e em que, de um modo preferido, adicional, o referido oligonucleótido é G10 (SEQ ID N°: 8), em que, de um modo ainda mais preferido, a referida composição compreendendo a referida partícula semelhante a vírus compreende uma pureza de, pelo menos, 98%, de um modo preferido, de, pelo menos, 99%, em que, de um modo ainda mais preferido, a quantificação da referida proteína de revestimento é realizada pelo ensaio de proteína de Bradford e em que, de um modo ainda mais preferido, a quantificação do referido oligonucleótido é realizada essencialmente, de um modo preferido, exactamente como divulgado no Exemplo 9.

A divulgação refere-se, ainda, à utilização de uma composição nucleotídica obtinível por qualquer um dos processos da invenção, num processo para a produção de uma composição compreendendo (i) uma partícula semelhante a vírus, em que a referida partícula semelhante a vírus é uma partícula semelhante a vírus de um bacteriófago de ARN e (ii) um oligonucleótido, em que o referido oligonucleótido está empacotado na referida partícula semelhante a vírus, em que, de um modo preferido, o referido processo compreende as etapas de (a) proporcionar a proteína de revestimento do referido bacteriófago de ARN; (b) proporcionar a referida composição nucleotídica; (c) produção de uma mistura, em que a referida mistura compreende: (i) a referida proteína de revestimento; (ii) um agente capaz de prevenir o auto-agrupamento da referida proteína de revestimento; (iii) o referido oligonucleótido; (d) remoção do referido agente da referida mistura; e (e) permitir que a

referida proteína de revestimento se auto-agrupa numa partícula semelhante a vírus; em que, de um modo preferido, o referido oligonucleótido contido na referida composição nucleotídica compreende um tempo de início do pico relativo de 50 a 110%, em que, de um modo preferido, adicional, o referido bacteriófago de ARN é Q $\beta$  e em que, de um modo ainda mais preferido, o referido oligonucleótido é G10 (SEQ ID N°: 8).

A divulgação refere-se, ainda, à utilização de um oligonucleótido compreendendo um tempo de início do pico relativo de 50 a 110% num processo para a produção de uma composição compreendendo (i) uma partícula semelhante a vírus, em que a referida partícula semelhante a vírus é um partícula semelhante a vírus de um bacteriófago de ARN e (ii) um oligonucleótido, em que o referido oligonucleótido está empacotado na referida partícula semelhante a vírus, em que, de um modo preferido, o referido processo compreende as etapas de (a) proporcionar a proteína de revestimento do referido bacteriófago de ARN; (b) proporcionar o referido oligonucleótido, (c) produção de uma mistura, em que a referida mistura compreende: (i) a referida proteína de revestimento; (ii) um agente capaz de prevenir o auto-agrupamento da referida proteína de revestimento; (iii) o referido oligonucleótido; (d) remoção do referido agente da referida mistura; e (e) permitir que a referida proteína de revestimento se auto-agrupa numa partícula semelhante a vírus; em que, de um modo preferido, o referido bacteriófago de ARN é Q $\beta$  e em que, de um modo preferido, adicional, o referido oligonucleótido é G10 (SEQ ID N°: 8).

A divulgação refere-se, ainda, a uma composição obtenível por qualquer um dos processos da invenção, a referida composição

compreendendo (i) uma partícula semelhante a vírus, em que a referida partícula semelhante a vírus é uma partícula semelhante a vírus de um bacteriófago de ARN e (ii) um oligonucleótido, em que o referido oligonucleótido está empacotado na referida partícula semelhante a vírus, em que, de um modo preferido, o referido bacteriófago de ARN é Q $\beta$  e em que, de um modo preferido, adicional, o referido oligonucleótido é G10 (SEQ ID N°: 8) e em que, de um modo ainda mais preferido, a pureza da referida composição é, pelo menos, 80%, de um modo preferido, pelo menos, 90%, de um modo mais preferido, pelo menos, 95%, de um modo ainda mais preferido, pelo menos, 98% e, de um modo muito preferido, pelo menos, 99% e em que, de um modo ainda mais preferido, a referida composição compreendendo a referida partícula semelhante a vírus compreende 15 a 30  $\mu$ g, de um modo preferido, 20 a 25  $\mu$ g e, de um modo muito preferido, cerca de 20  $\mu$ g do referido oligonucleótido por 100  $\mu$ g de proteína de revestimento.

A divulgação refere-se, ainda, a uma composição obtenível por qualquer um dos processos da invenção, a referida composição compreendendo (i) uma partícula semelhante a vírus, em que a referida partícula semelhante a vírus é uma partícula semelhante a vírus de um bacteriófago de ARN e (ii) um oligonucleótido, em que o referido oligonucleótido está empacotado na referida partícula semelhante a vírus, em que, de um modo preferido, o referido bacteriófago de ARN é Q $\beta$  e em que, de um modo preferido, adicional, o referido oligonucleótido é G10 (SEQ ID N°: 8), em que, de um modo ainda mais preferido, a pureza da referida composição é, pelo menos, 80%, de um modo preferido, pelo menos, 90%, de um modo mais preferido, pelo menos, 95%, de um modo ainda mais preferido, pelo menos, 98% e,

de um modo muito preferido, pelo menos, 99%, em que o referido oligonucleótido não está acessível a hidrólise de DNase.

## EXEMPLOS

### **Exemplo 1**

#### **Desagregação e Agregação do oligonucleótido G10 (SEQ ID Nº: 8)**

Quantificação de G10: O G10 foi quantificado por absorção de UV a 260 nm, corrigida pela absorção a 340 nm, em que 1 A<sub>260-340</sub> corresponde a uma concentração de 27,8 µg/mL, a 1 cm de percurso óptico.

Desagregação (escala de 10,0 mL, G10 a 260 µM, NaOH a 25 mM, 50 °C, 70 min): 45,91 mg de G 10 foram pesados num tubo de 15 mL. O pó foi dissolvido em 11,0 mL de água purificada (c= 325,3 µM; determinada por espectrometria). 8,0 mL da solução de oligonucleótido foram misturados com 250 µL de NaOH a 1 M e 1,75 mL de água purificada, num tubo de 15 mL (G10 a 260 µM, NaOH a 25 mM). A mistura foi desagregada durante 70 minutos, a 50 °C, num banho-maria. Após arrefecimento da solução sobre gelo, o pH foi ajustado com HCl a 0,5 M para pH 5,31; foram adicionados 540 µL de HCl a 0,5 M e 5 µL de NaOH a 1 M.

Agregação (escala de 10,0 mL, G10 a 175 µM, Na<sup>+</sup> a 250 mM, 85 °C, 9-24 min): 7,1 mL de solução de G10 desagregado, 2,13 mL de água purificada e 770 µL de NaCl a 3 M foram misturados num tubo de 15 mL (oligo a 175 µM, Na<sup>+</sup> a 250 mM). A mistura foi incubada durante 9 minutos, a 85 °C, num banho-maria. A solução

foi arrefecida num banho de gelo/água e armazenada sobre gelo até à sua utilização. As soluções de oligonucleótido agregado devem ser utilizadas no espaço de 3 horas após a preparação.

## **Exemplo 2**

### **Desagregação e Agregação dos Oligonucleótidos G4-4**

Desagregação: Foi preparada uma solução de oligonucleótido G4-4 a 260 µM (SEQ ID Nº: 2) e NaOH a 25 mM em água purificada. A solução foi aquecida a 50 °C durante 70 min e foi, depois, arrefecida sobre gelo, o pH da solução foi ajustado para um pH entre 5 e 8 utilizando HCl a 0,5 M.

Agregação: A solução compreendendo o G4-4 desagregado foi diluída com água purificada e NaCl a 3 M para uma concentração final de G4-4 a 230 µM e Na<sup>+</sup> a 250 mM. A mistura foi aquecida a 80 °C utilizando uma rampa de aquecimento de 6,8 °C/min, durante vários minutos (2 a 70 min). Após a incubação, a mistura foi arrefecida para 0-2 °C com uma rampa de temperatura de 6,8 °C/min.

A análise do produto por HPLC de exclusão de tamanho (ver o Exemplo 4) revelou que o oligonucleótido agregado foi obtido. (tempo de início do pico relativo: 88%).

### **Exemplo 3**

#### **Desagregação e Agregação de Oligonucleótidos**

Desagregação: É preparada uma solução a 260 pM de oligonucleótido G5-5 (SEQ ID N°: 3), G6-6 (SEQ ID N°: 4), G7-7 (SEQ ID N°: 5), G8-8 (SEQ ID N°: 6), G9-9 (SEQ ID N°: 7) e G11 (SEQ ID N°: 9), respectivamente, e NaOH a 25 mM em água purificada. A solução é aquecida para 50 °C durante 70 min e é, depois, arrefecida sobre gelo, o pH da solução é ajustado para um pH entre 5 e 8 utilizando HCl a 0,5 M.

Agregação: A solução compreendendo o oligonucleótido desagregado é diluída com água purificada e NaCl a 3 M para uma concentração final de oligonucleótido de 230 µM e Na<sup>+</sup> a 250 mM. A mistura foi aquecida a 80 °C utilizando uma rampa de aquecimento de 6,8 °C/min, durante vários minutos (2 a 70 min). Após a incubação, a mistura foi arrefecida para 0-2 °C com uma rampa de temperatura de 6,8 °C/min.

O produto do processo de agregação é analisado por HPLC de exclusão de tamanho (ver o Exemplo 4).

### **Exemplo 4**

#### **Análise do Estado de Agregação do oligonucleótido G10 por HPLC de Exclusão de Tamanho**

O estado de agregação de G10 foi analisado por HPLC analítico de exclusão de tamanho, utilizando as seguintes condições:

Coluna: TSKgel 5000 PWXL 7,8 mm \* 30,0 cm (Lote: 5PWX06GNMH3304, Art: 08023, Tosoh Bioscience)

Eluente: PBS (NaCl a 150 mM em tampão de fosfato de sódio a 20 mM, pH 7,2)

Volume de injecção: 40,0 µL (de um modo preferido, compreendendo uma concentração de cerca de 20 µM a cerca de 500 µM)

Caudal: 0,8 mL/min

Gradiente: Isocrático

Tempo de corrida: 20 min

Comprimento de onda: 215, 260 e 280 nm, avaliação de dados a 260 nm

Temp. de estufa de coluna: 25 °C

Temp. de amostrador automático: 8 °C

A cápside do bacteriófago Qβ foi utilizada como padrão.

O tempo de início do pico X% de G10 relativamente à cápside de Qβ (tempo de início do pico relativo de Qβ) foi calculado como se segue: X% = tempo de início do pico [min] do oligonucleótido, dividido pelo tempo de retenção do padrão de cápside de Qβ [min] x 100%, em que o tempo de início do pico do oligonucleótido foi determinado como o tempo quando a eluição do oligonucleótido se tornou detectável e em que o tempo de retenção do padrão de cápside de Qβ foi determinado como o tempo da ocorrência do pico máximo do padrão. Um Exemplo de um perfil

de eluição do oligonucleótido G10 e cápside do bacteriófago Q $\beta$  como padrão está representado na Figura 1. Com base nos cromatogramas representados na Figura 1, um tempo de início do pico relativo de 88% foi calculado para o oligonucleótido agregado.

### **Exemplo 5**

#### **Comparação dos Tempos de Estabelecimento de Pico Relativo de Oligonucleótido G10 Não Tratado, Desagregado e Agregado**

O tempo de início do pico relativo de G10 desagregado e agregado, preparado essencialmente como descrito no Exemplo 1, foi determinado e comparado ao tempo de início do pico relativo de G10 não tratado, como obtido de um fornecedor comercial. O G10 desagregado mostrou um tempo de início do pico relativo de 138% (136,9 - 140,3%; n = 5). As preparações de G10 que não foram submetidas ao tratamento de desagregação/agregação descrito no Exemplo 1 mostram um tempo de início do pico relativo na mesma gama que o G10 desagregado. Após desagregação e agregação, verificou-se que o tempo de início do pico de G10 foi 88%.

### **Exemplo 6**

#### **Impacto da Etapa de Desagregação**

Oligonucleótido G10 não tratado e oligonucleótido G10 desagregado, como descrito no Exemplo 1, foram submetidos a

agregação essencialmente como descrito no Exemplo 1, em que as seguintes condições de agregação foram escolhidas: G10 a 175 µM, Na<sup>+</sup> a 250 mM (por adição de NaCl a 3 M), incubação a 85 °C, durante 16 minutos, depois, arrefecimento sobre gelo. Ambas as preparações foram analisadas por HPLC de exclusão de tamanho (ver o Exemplo 4) utilizando cápside de Qβ e G10 não tratado como padrão. Os cromatogramas de HPLC resultantes são representados na Figura 2.

O G10 não tratado continha G10 agregado (ver a FIGURA 2A e 2B, caixa 1). O G10 agregado que não foi desagregado antes da agregação mostrou um peso molecular aparente equivalente ou superior à cápside de Qβ (Figura 2A, caixa 2). O tempo de início do pico relativo foi cerca de 75%. O G10 agregado que foi desagregado antes da agregação exibiu um peso molecular aparente inferior à cápside de Qβ (Figura 2B, caixa 2). O tempo de início do pico relativo foi cerca de 88%.

### **Exemplo 7**

#### **Análise do Estado de Agregação do Oligonucleótido G10 por Dicroísmo Circular**

Os espectros de CD de G10 não tratado, desagregado e agregado (preparado essencialmente como descrito no Exemplo 1), assim como de cápside de Qβ empacotada com G10 (QbG10 obtido como descrito no Exemplo 10), foram registados entre 200 nm e 300 nm, num espectrofotômetro J-715 JASCO. (Figura 3). O espectro de G10 agregado é caracterizado por uma forte banda positiva (elíptica alta), com um máximo a 262 nm e uma depressão a 240 nm. Estes sinais são referidos como correspondendo ao

espectro típico de tetraplexos de ADN com uma orientação paralela de cadeias (Lu *et al.*, *Biochemistry* 31, p. 2455, 1992). Facto importante, a forma do espectro de CD na região de 250 nm - 300 nm não se altera em espectros de VLP reagrupadas na presença de G10 agregado. Deste modo, o G10 parece não sofrer uma alteração conformacional após empacotamento. O ligeiro aumento da amplitude a 262 nm reflecte, possivelmente, o empacotamento selectivo de G10 agregado na cápside de Q $\beta$ , resultando numa proporção superior de tetraplexos após empacotamento, em comparação com G10 agregado que ainda contém uma fracção de moléculas não agregadas. Em contraste, o espectro de G10 não tratado é caracterizado por elipticidades baixas, sem máximos definidos, indicando uma ausência de elementos de estrutura secundária e terciária definidas. Os sinais baixos de CD também são observados para G10 desagregado, ainda que a ocorrência de um máximo a 295 nm e um mínimo a 262 nm possa reflectir a presença de alguns confórmeros de tetraplexos antiparalelos (P. Balagurumoorthy *et al.*, *Nucleic Acids Research* 20, p. 4061, 1992).

### **Exemplo 8**

**Empacotamento de VLP de Q $\beta$  com G10 por desagrupamento/reagrupamento**

Desagrupamento de VLP de Q $\beta$ : 45 mg de VLP de Q $\beta$  (2,5 mg/mL, como determinado por análise de Bradford) em PBS (fosfatos a 20 mM, NaCl a 150 mM, pH 7,5), foram reduzidos com DTT a 10 mM, durante 15 min, à t.a., sob condições de agitação. Depois, foi adicionado cloreto de magnésio para uma concentração final de 0,7 M e a incubação foi continuada, durante 15 min, à t.a., sob

condições de agitação, conduzindo a precipitação do ARN de célula hospedeira encapsulado e concomitante desagregação das VLP. A solução foi centrifugada 10 min, a 4000 rpm, a 4 °C (Eppendorf 5810 R, em rotor de ângulo fixo A-4-62, utilizado em todas as etapas seguintes), de modo a remover o ARN precipitado da solução. O sobrenadante, contendo a proteína de revestimento de Q $\beta$  libertada, dimérica, foi utilizado para as etapas de purificação cromatográfica.

Purificação de proteína de revestimento de Q $\beta$  por cromatografia de permuta catiónica e cromatografia de exclusão de tamanho: O sobrenadante da reacção de desagrupamento, contendo proteína de revestimento dimérica, proteínas de célula hospedeira e ARN de célula hospedeira residual, foi carregado numa coluna SP-Sepharose FF (xk16/20, 6 mL, Amersham Bioscience). A coluna foi equilibrada com tampão de fosfato de sódio a 20 mM, pH 7 e a amostra foi diluída 1:15 em água para ajustar a condutividade abaixo de 10 mS/cm, de modo a alcançar-se ligação apropriada da proteína de revestimento à coluna. A eluição da proteína de revestimento ligada foi alcançada por um gradiente de etapas a fosfato de sódio a 20 mM/cloreto de sódio a 500 mM e a proteína foi recolhida num volume de fracção de, aproximadamente, 25 mL. A cromatografia foi efectuada à t.a., com um caudal de 5 mL/min, durante todas as etapas e a absorvência foi monitorizada a 260 nm e 280 nm. Numa segunda etapa, a proteína de revestimento de Q $\beta$  isolada (a fracção eluída da coluna de permuta catiónica) foi carregada numa coluna Sephadryl S-100 HR (xk26/60, 320 mL, Amersham Bioscience), equilibrada com fosfato de sódio a 20 mM/cloreto de sódio a 250 mM; pH 7,2. A cromatografia foi efectuada à t.a., com um caudal de 2,5 mL/min e a absorvência foi monitorizada a 260 nm e 280 nm. Foram recolhidas fracções de 5 mL.

Caracterização de proteína de revestimento de Q $\beta$  purificada por cromatografia analítica de exclusão de tamanho: Uma amostra de proteína de revestimento de Q $\beta$  purificada foi analisada por cromatografia analítica de exclusão de tamanho (Figura 1C) e comparada com i) VLP de Q $\beta$  intacta (Figura 4A), a qual tinha sido purificada de lisado de *E. coli* e que foi utilizada como material de base para o processo de purificação e ii) ao sobrenadante da reacção de desagrupamento (Figura 4B). A separação eficiente de moléculas de ARN da proteína de revestimento é indicada pela ausência de qualquer pico semelhante a ARN (razão típica de A280/A260 = 0,5) na Figura 4C e pela presença de um pico semelhante a proteína único (razão típica de A280/A260 = 1,7).

Agrupamento de QBG10 por diafiltração: A proteína de revestimento purificada (em fosfato de sódio a 20 mM, pH 7,2, NaCl a 250 mM) foi misturada com água e solução stock de ureia, NaCl, DTT e oligonucleótido G10 agregado (preparado essencialmente como descrito no Exemplo 1). O volume da mistura foi 50 mL e as concentrações finais dos componentes foram proteína de revestimento a 1 mg/mL, ureia a 1,0 M, NaCl a 250 mM, DTT a 2,5 mM e G10 a 0,24 mg/mL. A solução foi, depois, diafiltrada, à temperatura ambiente, contra 300 mL de fosfato de sódio a 20 mM, NaCl a 250 mM, pH 7,2, utilizando um cartucho de corte de 30 kDa (Pellicon XL, Millipore) e um caudal cruzado de 10 mL/min e um caudal de permeado de 2,5 mL/min. Foi adicionada H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> para concentração final de 7 mM e a solução incubada, durante 1 h, à t.a., de modo a induzir a formação de ligações persulfureto. A solução foi, depois, diafiltrada contra 500 mL de fosfato de sódio a 20 mM, NaCl a 150 mM, pH 7,2, utilizando um cartucho de corte de 300 kDa (Pellicon XL, Millipore) e um

caudal cruzado de 10 mL/min e um caudal de permeado de 2,5 mL/min, de modo a remover o excesso de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> e oligonucleótidos G10 não empacotados do produto Q $\beta$ G 10 agrupado.

### **Exemplo 9**

#### **Análise do Produto de Empacotamento Q $\beta$ G10 e Determinação do Rendimento do processo de empacotamento**

Caracterização de VLP de Q $\beta$ G10 empacotada por cromatografia analítica de exclusão de tamanho: Uma amostra de VLP de Q $\beta$ G10 empacotada foi analisada por cromatografia analítica de exclusão de tamanho (Figura 5) e comparada a VLP de Q $\beta$  intacta, que tinha sido purificada de lisado de *E. coli*. A referida cromatografia analítica de exclusão de tamanho foi realizada utilizando os seguintes parâmetros:

Coluna:	Bio-Sil SEC 250, 7,8 x 300 mm, Cat. N° 125-0062
Eluente:	Fosfato de sódio a 50 mM, pH 6,5, NaCl a 150 mM
Gradiente:	Isocrático
Temperatura de coluna:	25 °C
Temperatura de amostrador automático:	8 °C
Caudal:	1,0 mL/min
Concentração de amostra:	Proteína a 1,0 mg/mL
Volume de injecção:	40 µL
Comprimento de onda de	280 nm

avaliação:

Largura de banda: 4 nm

Tempo de corrida: 20 min

Preparação de amostra:

A amostra foi diluída para 1,0 mg/mL utilizando eluente, a amostra foi brevemente agitada em vórtice e centrifugada a 16000 g, durante 10 minutos, a 4 °C.

A presença de VLP correctamente agrupada no produto foi confirmada por um pico em migração com tempo de retenção idêntico ao pico representando VLP de Q $\beta$  nativa. O pico observado para VLP de Q $\beta$ G10 (Figura 5D) é dominado pelo conteúdo de ácido nucleico da VLP, porque o coeficiente de absorção dos ácidos nucleicos a 260 nm é mais de 100 vezes superior ao coeficiente de absorção da proteína de revestimento. Verificou-se que a razão de A260/A280 de VLP de Q $\beta$ G10 purificada foi 1,70 (1,65 - 1,76; n = 5), que é característica para G 10 (A260/A280 = 1,74), em que se verificou que a razão de A260/A280 da VLP de Q $\beta$  foi 1,87 (1,85 - 1,90; n = 10) que é característica para ARN.

Caracterização de VLP de Q $\beta$ G10 empacotada por análise de SDS-PAGE: Uma amostra de G10 de Q $\beta$  empacotado foi analisada por SDS-PAGE não redutor (Figura 6) e comparada a VLP de Q $\beta$  intacta, que tinha sido purificada de lisado de *E. coli*. A presença de VLP correctamente agrupada no produto foi confirmada pela formação de bandas de formas pentaméricas e hexaméricas ligadas por persulfureto da proteína de revestimento, semelhantes às VLP de Q $\beta$  intactas, indicando a correcta disposição estrutural das

unidades de proteína de revestimento na VLP de Q $\beta$ G10 agrupada *in vitro*.

Quantificação de oligonucleótido G10 empacotado: As amostras de VLP de Q $\beta$ G10 (0,25 mg/mL em PBS) foram tratadas por TCEP a 0,1 mM (Tris(2-cloroetil)fosfato) (15 min, à t.a.), de modo a reduzir as ligações persulfureto. O NaCl foi adicionado às amostras reduzidas (concentração final de 1 M) e as misturas foram incubadas, durante 15 min, a 60 °C, de modo a precipitar o componente de proteína. Após centrifugação, os sobrenadantes resultantes foram incubados, durante 5 min, a 95 °C, arrefecidos sobre gelo, durante 1 min e, depois, o valor de A260 foi medido. A concentração de oligonucleótido G10 no sobrenadante foi calculada de acordo com a fórmula:

$$c(G10) \text{ (mg/mL)} = A260 \times 1,12 \times 9600/344580, \text{ onde:}$$

1,12 = factor de correção para o teor de sal na amostra

9600 = massa molecular de oligonucleótido G 10

344580 = coeficiente de absorção molar específica de oligonucleótido G10.

Tipicamente, a quantidade de oligonucleótido G10 empacotado foi 0,2 mg por mg de proteína de revestimento de Q $\beta$ .

Teor de G10 de VLP de Q $\beta$ G10 e cálculo de rendimento para a reacção de empacotamento: O G10 agregado foi empacotado em VLP de Q $\beta$  por agrupamento/reagrupamento da VLP, como descrito no Exemplo 8. Foram introduzidos 953 mg de oligonucleótido G10 para reagrupamento com 4000 mg de dímero de Q $\beta$  purificado. A reacção

produziu Q $\beta$ G10 compreendendo 20  $\mu$ g de oligonucleótido G10 por 100  $\mu$ g de proteína (teor de proteína determinado por análise de Bradford ou HPLC). O rendimento de G10 da reacção de empacotamento foi 63%, a um rendimento de proteína de 75%.

### **Exemplo 10**

#### **Agrupamento de Q $\beta$ G10 por diafiltração e Determinação de Rendimento**

A proteína de revestimento de Q $\beta$  purificada foi obtida essencialmente como descrito no Exemplo 8. A proteína de revestimento em fosfato de sódio a 20 mM, pH 7,2, NaCl a 250 mM foi misturada com água e solução stock de ureia, NaCl, DTT e oligonucleótido G10 agregado (preparado essencialmente como descrito no Exemplo 1; o tempo de início do pico relativo de G10 desagregado foi 135%, o tempo de início do pico relativo de G10 agregado foi 88%). O volume da mistura foi 1,6 L e as concentrações finais dos componentes foram proteína de revestimento a 2,5 mg/mL, ureia a 1,0 M, NaCl a 250 mM, DTT a 2,5 mM e G10 a 0,6 mg/mL. A solução foi, depois, diafiltrada, à temperatura ambiente, contra 9,6 L de fosfato de sódio a 20 mM, NaCl a 250 mM, pH 7,2, utilizando um cartucho de corte de 30 kDa (Pellicon Mini2, área de filtro de 0,1  $m^2$ , Millipore) e um caudal cruzado de 384 L/(h\*m<sup>2</sup>) e um caudal de permeado de 96 L/(h\*m<sup>2</sup>). Foi adicionada H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> para concentração final de 2 mM e a solução incubada, durante 1 h, à t.a., de modo a induzir a formação de ligações persulfureto. A solução foi, depois, diafiltrada contra 16 L de fosfato de sódio a 20 mM, NaCl a 150 mM, pH 7,2, utilizando um cartucho de corte de 300 kDa (Pellicon Mini 2, área de filtro de 0,1  $m^2$ , Millipore) e um

caudal cruzado de 300 V(h\*m<sup>2</sup>) e um caudal de permeado de 100 L/(h\*m<sup>2</sup>), de modo a remover excesso de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> e oligonucleótidos G10 não empacotados do produto Q $\beta$ G10 agrupado. O produto foi concentrado para 2,5 mg/mL por filtração de caudal tangencial e filtrado através de um filtro de 0,22  $\mu$ m. As principais etapas de processo são resumidas na Tabela 1.

**Tabela 1:** Resumo das etapas de processo para agrupamento e purificação de Q $\beta$ G10.

Etapa do Processo	Parâmetros		Saída da Etapa do Processo
Desagregação de G10	Concentração de G10:	260 $\mu$ M	tempo de início do pico relativo de G10: 138%
	Concentração de NaOH:	25 mM	
	Temperatura:	50 °C	
	Tempo de aquecimento:	70 minutos	
	Escala: 1,1 g de G10, V=440 mL (em Aliquotas de 10 mL)		
Neutralização da solução de G10 desagregado	Ácido Utilizado:	H <sub>3</sub> PO <sub>4</sub> a 0,5 M	pH 7,2
Reagregação da solução de G10	Concentração de G10:	175 $\mu$ M	tempo de início do pico relativo de G10: 88%
	Concentração de Na <sup>+</sup> :	250 mM	
	Temperatura:	85 °C	
	Tempo de aquecimento:	10 minutos	
	Escala: 1,1 g de G10, V=654 mL (em Aliquotas de 10 mL)		

(continuação)

Etapa do Processo	Parâmetros		Saída da Etapa do Processo
	Aliquotas de 10 mL)		
Descongelação do material de partida	Temperatura:	22 °C	Solução de dímero de Qbeta
Preparação da mistura de reagrupamento.	Concentração de dímero:	2,5 mg/mL	Solução para diafiltração 1
	Concentração de ureia:	1 M	
	Concentração de DTT:	2,5 mM	
	Concentração de G10:	62,5 µM	
	Tempo de mistura:	60 ± 10 minutos	
	Temperatura:	22 ± 3 °C	
	Escala:	4 g de Dímero de Qβ, V=1,61	
Diafiltração 1 contínua	Membrana:	MWCO de 30 kDa	O dímero de Qbeta forma VLP em torno do material de núcleo de G10, devido à remoção de ureia e DTT.
	Área:	0,1 m²	
	Volumes de diafiltração:	6 (9,6 L de permeado recolhido)	
	Tampão:	NaP250, pH 7,2	
	Duração de alvo:	60 minutos	
	Temperatura:	22 °C	
	Caudal:	96 L/(h*m²) V=1,61	
Oxidação com peróxido de hidrogénio	Concentração de H₂O₂:	2 mM	Formação de pontes persulfureto e, por conseguinte, estabilização da VLP
	Temperatura:	22 °C	
	Tempo de reacção:	60 ± 10 minutos V=1,61	

(continuação)

Etapa do Processo	Parâmetros		Saída da Etapa do Processo
Diafiltração 2 Contínua	Membrana:	MWCO de 300 kDa	Remoção de peróxido de hidrogénio e G10 residual, não empacotado.
	Área:	0,1 m <sup>2</sup>	
	Volumes de diafiltrado:	10 (16 L)	
	Tampão:	tampão farmaceuticamente aceitável	
	Temperatura:	22 ± 3 °C	
Concentração de QbG 10	Caudal:	100 L/(h*m <sup>2</sup> ) V=1,61	Concentração=2,5 mg/mL
	Membrana:	MWCO de 300 kDa	
	Área:	0,1 m <sup>2</sup>	
	Temperatura:	22 ± 3 °C	
Filtração de QbG10	Caudal de Permeado:	< 100 L/(h*m <sup>2</sup> ) V=1,21	Redução de carga microbiana
	Filtro de membrana PES de 0,22 µm		

A pureza do produto foi analisada por cromatografia de exclusão de tamanho e verificou ser 99,28%, i. e., o pico de QbG10 perfaz 99,28% da área de pico integral numa cromatografia corrida como descrito no Exemplo 4. O rendimento de proteína e rendimento de oligonucleótido foram determinados como descrito no Exemplo 8. O rendimento de proteína em todo o processo foi 75%. O rendimento de oligonucleótido em todo o processo foi 75%.

### **Exemplo 11**

#### **Impacto do Estado de Agregação de G10 no Processo de Agrupamento**

Quando o G 10, com um tempo de início do pico relativo de 139%, foi utilizado no processo de agrupamento, como descrito no Exemplo 8, apenas foram formadas quantidades negligenciáveis de GbG10 e não pôde ser isolado produto de VLP.

### **Exemplo 12**

#### **Empacotamento de VLP de AP205 e GA355 com G10 por Desagrupamento/Reagrupamento**

Desagrupamento: foram incubados 50-100 mg de VLP de AP205 ou GA355 (como determinado por análise de Bradford) em tampão A ( $\text{NaPO}_4$  a 5 mM, pH 6,8, NaCl a 100 mM,  $\text{MgCl}_2$  a 2 mM), a 30 °C, durante 16 horas, com RNase A (Sigma) e Benzonase (Novagen), a 1 mg/mL e 5 U/mL, respectivamente. No caso de VLP de AP205, a desoxidação das pontes persulfureto internas foi realizada anteriormente à adição de RNase A e Benzonase, por adição de DTT a 20 mM, seguida de uma incubação de 30 min, a 37 °C. Após adição de NaCl a 1 M, a precipitação das proteínas de revestimento virais foi induzida por incubação de 15 min, a 70 °C. As proteínas de revestimento precipitadas foram sedimentadas por centrifugação, durante 10 min, 27000 g, a 4 °C. O sobrenadante contendo RNase A, Benzonase e ácidos nucleicos degradados foi descartado. Os sedimentos foram ressuspensos em tampão B ( $\text{NaPO}_4$  a 20 mM, pH 7,2, ureia a 6 M) e incubados, durante 10 min, à temperatura ambiente.

Purificação de proteínas de revestimento por cromatografia de permuta catiónica: As soluções foram clarificadas por centrifugação, durante 10 min, 27000 g, a 4 °C. Um sedimento negligenciável foi descartado. E o sobrenadante contendo as proteínas de revestimento desagrupadas foi aplicado numa coluna SP sepharose FF (16/20, Amersham Biosciences), equilibrada com tampão B (NaPO<sub>4</sub> a 20 mM, pH 7,2, ureia a 6 M). O escoamento foi descartado. Após uma extensa lavagem com tampão B (15 CV), a coluna foi ajustada com um gradiente linear de tampão B para tampão C (NaPO<sub>4</sub> a 20 mM, pH 7,2, ureia a 1 M) com uma extensão de gradiente de 37,5 CV. Durante o carregamento, lavagem e eluição, a absorbância a 254 nm e 280 nm foi monitorizada. As proteínas de revestimento foram eluídas como uma fracção com tampão D (NaPO<sub>4</sub> a 20 mM, pH 6,5, ureia a 1 M, NaCl a 300 mM) e analisadas por LDS-PAGE, seguido de coloração de Coomassie. As fracções de proteína eluída foram armazenadas a 4 °C como "proteína de revestimento desagrupada". As concentrações de proteína foram determinadas por análise de Bradford.

Reagrupamento: A proteína de revestimento de AP205 ou GA355 purificada foi utilizada num excesso de cinco vezes (p/p) para oligonucleótido G10. As proteínas de revestimento foram misturadas com o oligonucleótido G10 num tampão de reagrupamento contendo ureia a 1 M e DTT a 2,5 mM e incubadas, durante uma hora, à temperatura ambiente. Após incubação, a mistura de reagrupamento foi dialisada, durante 24 horas, contra 5 litros de PBS. A suspensão resultante foi centrifugada, durante 10 min, 27000 g, a 4 °C. Um sedimento negligenciável foi descartado. O sobrenadante continha as VLP reagrupadas e empacotadas. A concentração de proteína foi determinada por análise de Bradford e as VLP reagrupadas e empacotadas foram concentradas com

dispositivos de filtro centrífugos (Amicon Ultra 15, MWCO de 10 K).

Purificação de VLP reagrupadas e empacotadas: Até 25 mg de proteína total foram carregados numa Sepharose™ CL-4B (26/60, Amersham Biosciences) equilibrada com PBS. A cromatografia de exclusão de tamanho foi realizada com tampão de equilíbrio, à temperatura ambiente, com um caudal de 1,25 mL/min. Durante a eluição, a absorbância a 254 nm e 260 nm foi monitorizada. Foram isolados dois picos. Um pico de elevado peso molecular principal precedeu um pequeno pico de peso molecular aparente inferior. O pico principal revelou um peso molecular aparente consistente com as VLP purificadas, como mostrado por SE-HPLC. A análise das VLP de AP205 ou GA355 empacotadas com oligonucleótido G10 é realizada essencialmente como mostrado no Exemplo 16 do documento WO03/024481 (p. 131 ff).

### **Exemplo 13**

#### **Empacotamento de VLP de FR com G10 por Desagrupamento/Reagrupamento**

Desagrupamento: 50-100 mg de VLP de FR (como determinado por análise de Bradford) em tampão A (NaPO<sub>4</sub> a 5 mM, pH 6,8, NaCl a 100 mM, MgCl<sub>2</sub> a 2 mM) são incubados, a 30 °C, durante 16 horas, com RNase A (Sigma) e Benzonase (Novagen), a 1 mg/mL e 5 U/mL, respectivamente. Após adição de NaCl a 1 M, a precipitação das proteínas de revestimento de FR é induzida por uma incubação de 15 min, a 70 °C. As proteínas de revestimento precipitadas são sedimentadas por centrifugação, durante 10 min, 27000 g, a 4 °C. O sobrenadante contendo RNase A, Benzonase e ácidos nucleicos

degradados é descartado. O sedimento é ressuspenso em tampão B (NaPO<sub>4</sub> a 20 mM, pH 7,2, ureia a 6 M) e incubado, durante 10 min, à temperatura ambiente.

Purificação de proteínas de revestimento de FR por cromatografia de permuta catiónica: A solução é clarificada por centrifugação, durante 10 min, 27000 g, a 4 °C. Um sobrenadante negligenciável é descartado e o sobrenadante contendo as proteínas de revestimento desagrupadas é aplicado numa coluna SP Sepharose™ (16/20, Amersham Biosciences), equilibrada com tampão B. O escoamento é descartado. Após uma extensa lavagem com tampão B (15 CV), a coluna é ajustada com um gradiente linear de tampão B para tampão C (NaPO<sub>4</sub> a 20 mM, pH 7,2, ureia a 1 M) com uma extensão de gradiente de 37,5 CV. Durante o carregamento, lavagem e eluição, a absorbância a 254 nm e 280 nm é monitorizada. As proteínas de revestimento de FR são eluídas como uma fracção com tampão D (NaPO<sub>4</sub> a 20 mM, pH 6,5, ureia a 1 M, NaCl a 300 mM) e analisadas por LDS-PAGE, seguido de coloração de Coomassie. As fracções de proteína eluída são armazenadas a 4 °C como "proteína de revestimento desagrupada". A concentração de proteína é determinada por análise de Bradford.

Reagrupamento: A proteína de revestimento de FR purificada é utilizada num excesso de cinco vezes (p/p) para oligonucleótido G10. As proteínas de revestimento de FR são misturadas com o oligonucleótido G10 num tampão de reagrupamento contendo ureia a 1 M e DTT a 2,5 mM e incubadas, durante uma hora, à temperatura ambiente. Após incubação, a mistura de reagrupamento é dialisada, durante 24 horas, contra 5 litros de PBS. A suspensão resultante é centrifugada, durante 10 min, 27000 g, a 4 °C. Um sedimento negligenciável é descartado. O

sobrenadante contém as VLP de FR reagrupadas e empacotadas. A concentração de proteína é determinada por análise de Bradford e as VLP de FR reagrupadas e empacotadas são concentradas com dispositivos de filtro centrífugos (Amicon Ultra 15, MWCO de 10 K).

Purificação de VLP de FR reagrupadas e empacotadas: Até 25 mg de proteína total são carregados numa Sepharose™ CL-4B (26/60, Amersham Biosciences) equilibrada com PBS. A cromatografia de exclusão de tamanho é realizada com tampão de equilíbrio, à temperatura ambiente, com um caudal de 1,25 mL/min. Durante a eluição, a absorbância a 254 nm e 260 nm é monitorizada. São isolados dois picos. Um pico de elevado peso molecular principal precede um pequeno pico de peso molecular aparente inferior. O pico principal revela um peso molecular aparente consistente com as VLP de FR purificadas, como mostrado por SE-HPLC. A análise das VLP de FR empacotadas com oligonucleótido G10 é realizada essencialmente como mostrado no Exemplo 16 do documento WO 03/024481 (p. 131 ff).

#### **Exemplo 14**

#### **Agrupamento de Q $\beta$ G8 por diafiltração e Determinação de Rendimento**

A proteína de revestimento de Q $\beta$  purificada é obtida essencialmente como descrito no Exemplo 8. A proteína de revestimento em fosfato de sódio a 20 mM, pH 7,2, NaCl a 250 mM é misturada com água e solução stock de ureia, NaCl, DTT e oligonucleótido G8 agregado (preparado essencialmente como descrito no Exemplo 3; o tempo de início do pico relativo de G8

desagregado é 113%, o tempo de início do pico relativo de G8 agregado é 88%). O volume da mistura é 1,6 L e as concentrações finais dos componentes são proteína de revestimento a 1 mg/mL, ureia a 1,0 M, NaCl a 250 mM, DTT a 2,5 mM e G8 a 0,24 mg/mL. A solução é, depois, diafiltrada, à temperatura ambiente, contra 9,6 L de fosfato de sódio a 20 mM, NaCl a 250 mM, pH 7,2, utilizando um cartucho de corte de 30 kDa (Pellicon Mini2, área de filtro de 0,1 m<sup>2</sup>, Millipore) e um caudal cruzado de 384 L/(h\*m<sup>2</sup>) e um caudal de permeado de 96 L/(h\*m<sup>2</sup>). É adicionada H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> para concentração final de 2 mM e a solução é incubada, durante 1 h, à t.a., de modo a induzir a formação de ligações persulfureto. A solução é, depois, diafiltrada contra 16 L de fosfato de sódio a 20 mM, NaCl a 150 mM, pH 7,2, utilizando um cartucho de corte de 300 kDa (Pellicon Mini 2, área de filtro de 0,1 m<sup>2</sup>, Millipore) e um caudal cruzado de 300 L(h\*m<sup>2</sup>) e um caudal de permeado de 100 L/(h\*m<sup>2</sup>), de modo a remover o excesso de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> e oligonucleótidos G8 não empacotados do produto QβG8 agrupado. O produto é concentrado para 2,5 mg/mL por filtração de caudal tangencial e filtrado através de um filtro de 0,22 µm.

LISTAGEM DE SEQUÊNCIAS

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

<120> PROCESSOS PARA O EMPACOTAMENTO DE OLIGONUCLEÓTIDOS EM PARTÍCULAS SEMELHANTES A VÍRUS DE BACTERIÓFAGOS DE ARN

<130> P1070PC00

<150> US 60/812592  
<151> 2006-06-12

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

<160> 23

<170> PatentIn versão 3.3

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

<220>  
<223> sintetizado quimicamente

<400> 1  
gacgatcg

10

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

<220>  
<223> sintetizado quimicamente

<400> 2  
gggggacgat cgtcgaaaaa 18

<210> 3  
<211> 20  
<212> ADN  
<213> sequência artificial

<220>  
<223> sintetizado quimicamente

<400> 3  
ggggggacga tcgtcgaaaaa 20

<210> 4  
<211> 22  
<212> ADN  
<213> sequência artificial

<220>  
<223> sintetizado quimicamente

<400> 4  
gggggggacg atcgtcggg gg 22

<210> 5  
<211> 24  
<212> ADN  
<213> sequência artificial

<220>  
<223> sintetizado quimicamente

<400> 5  
ggggggggac gatcgtcggg gggg 24

<210> 6  
<211> 26  
<212> ADN  
<213> sequência artificial

<220>  
<223> sintetizado quimicamente

<400> 6  
ggggggggga cgatcgtcgg gggggg 26

<210> 7  
<211> 28  
<212> ADN  
<213> sequência artificial

<220>  
<223> sintetizado quimicamente

<400> 7  
ggggggggggg acgatcgatcg gggggggggg 28

<210> 8  
<211> 30  
<212> ADN  
<213> sequência artificial

<220>  
<223> sintetizado quimicamente

<400> 8  
ggggggggggg gacgatcgatcg gggggggggg 30

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

<220>  
<223> sintetizado quimicamente

<400> 9  
ggggggggggg ggacgatcgatcg cggggggggg gg 32

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

<400> 10

Ala Lys Leu Glu Thr Val Thr Leu Gly Asn Ile Gly Lys Asp Gly Lys  
1 5 10 15

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

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

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

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

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

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

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

Asn Pro Ala Tyr  
130

<210> 11

<211> 329

<212> PRT

<213> bacteriófago Qb

<400> 11

Met Ala Lys Leu Glu Thr Val Thr Leu Gly Asn Ile Gly Lys Asp Gly  
1 5 10 15

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Phe Arg Gly Cys Arg Gly Asn Gly Tyr Ile Asp Leu Asp Ala Thr Tyr  
225 230 235 240

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

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

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

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

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

Gln Ala Val Ile Val Val Pro Arg Ala  
325

<210> 12

<211> 129

<212> PRT

<213> bacteriófago R17

<400> 12

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

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

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

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

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

Lys Asp Gly Asn Pro Ile Pro Ser Ala Ile Ala Ala Asn Ser Gly Ile  
115               120               125

Tyr

<210> 13

<211> 130

<212> PRT

<213> bacteriófago fr

<400> 13

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

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

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

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

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

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

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

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

Ile Tyr  
130

<210> 14

<211> 130

<212> PRT

<213> bacteriófago GA

<400> 14

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

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

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

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

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

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

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

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

Tyr Ala  
130

<210> 15  
<211> 132  
<212> PRT  
<213> bacteriófago SP

<400> 15

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

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

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

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

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

Asp Pro Ser Val Thr Arg Ser Ala Phe Ala Asp Val Thr Leu Ser Phe  
85               90               95

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

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

Asn Pro Ala Tyr  
130

<210> 16  
<211> 329  
<212> PRT  
<213> bacteriófago SP

<400> 16

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

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

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

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

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

Pro Ser Val Thr Arg Ser Ala Phe Ala Asp Val Thr Leu Ser Phe Thr  
85 90 95

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

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

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

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

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

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

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

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

Ile Ala Asn Arg Arg Cys Arg Gly Asn Gly Tyr Ile Asp Leu Asp  
225 230 235 240

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

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

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

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

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

Val Gln Thr Val Ile Ile Ile Pro Ser  
325

<210> 17

<211> 130

<212> PRT

<213> bacteriófago MS2

<400> 17

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

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

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

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

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

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

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

Leu Lys Asp Gly Asn Pro Ile Pro Ser Ala Ile Ala Ala Asn Ser Gly  
115 120 125

Ile Tyr  
130

<210> 18

<211> 133

<212> PRT

<213> bacteriófago M11

<400> 18

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

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

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

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

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

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

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

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

Leu Asn Pro Ala Tyr  
130

<210> 19

<211> 133

<212> PRT

<213> bacteriófago MX1

<400> 19

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

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

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

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

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

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

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

Leu Asn Pro Ala Tyr  
130

<210> 20

<211> 330

<212> PRT

<213> bacteriófago NL95

<400> 20

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

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

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

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

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

Asp Pro Ser Val Thr Arg Ser Gly Ser Arg Asp Val Thr Leu Ser Phe  
85 90 95

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

Ala Ala Leu Leu Lys Asp Asp 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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

<210> 21

<211> 129

<212> PRT

<213> bacteriófago f2

<400> 21

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

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

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

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

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

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

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

Lys Asp Gly Asn Pro Ile Pro Ser Ala Ile Ala Ala Asn Ser Gly Ile  
115                      120                       125

Tyr

<210> 22

<211> 128

<212> PRT

<213> bacteriófago PP7

<400> 22

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

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

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

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

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

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

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

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

<210> 23

<211> 131

<212> PRT

<213> bacteriófago AP205

<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

Lisboa, 20 de Agosto de 2013

## REIVINDICAÇÕES

1. Processo para a produção de uma composição nucleotídica compreendendo um oligonucleótido, o referido processo compreendendo as etapas de:
  - (a) proporcionar um oligonucleótido na solução I, em que o referido oligonucleótido compreende, pelo menos, uma extensão de poli G; e em que a referida solução I compreende um pH alcalino, em que, de um modo preferido, o referido pH é 8 a 13, de um modo mais preferido, o referido pH é 12;
  - (b) desagregação do referido oligonucleótido, em que a referida desagregação compreende as etapas de
    - (i) ajustamento da temperatura da solução I à temperatura I, em que a referida temperatura I é 4 a 70 °C, de um modo preferido, 45 a 70 °C, de um modo mais preferido, cerca de 50 °C e, de um modo muito preferido, 50 °C;
    - (ii) incubação do referido oligonucleótido na referida solução I à referida temperatura I, em que a referida incubação é realizada até que o referido oligonucleótido comporte um tempo de início do pico relativo superior a 110%; e
    - (iii) ajustamento da temperatura da referida solução I à temperatura II, em que a referida temperatura II é 0 a 70 °C, em que, de um modo preferido, a referida temperatura II é inferior à temperatura I e em que, de um modo preferido, adicional, a temperatura II é 0 a 25 °C, de um modo muito preferido, 0 a 2 °C.

(c) ajustamento do pH da referida solução I a pH 5 a 8, em que, de um modo preferido, o referido ajustamento do referido pH da referida solução I é realizado até que o referido pH seja 6 a 7; e

(d) agregação do referido oligonucleótido, em que a referida agregação compreende as etapas de:

(i) proporcionar o referido oligonucleótido na solução II, em que a referida solução II compreende pH 5 a 8 e, pelo menos, 20 mM de um catião, em que o referido catião é seleccionado do grupo consistindo de  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ ,  $\text{NH}_4^+$ ,  $\text{Li}^+$ ,  $\text{Ca}^{2+}$  e  $\text{Mg}^{2+}$ ; e em que, de um modo preferido, a referida solução II compreende 200 a 275 mM do referido catião, de um modo preferido, 250 mM;

(ii) ajustamento da temperatura da solução II à temperatura III, em que a referida temperatura III é 50 a 99 °C, de um modo preferido, 80 a 90 °C, de um modo mais preferido, cerca de 85 °C e, de um modo muito preferido, 85 °C;

(iii) incubação do referido oligonucleótido na solução II à temperatura III, em que a referida incubação é realizada até que o referido oligonucleótido compreenda um tempo de início do pico relativo de 50 a 110%; e

(iv) ajustamento da temperatura da solução II à temperatura IV, em que a referida temperatura IV é inferior a 50 °C, em que, de um modo preferido, a referida temperatura IV é 0 a 25 °C, de um modo mais preferido, 0 a 2 °C.

2. Processo da reivindicação anterior, em que o referido ajustamento da temperatura da referida solução I à temperatura II é realizado com uma rampa de temperatura de,

pelo menos, 3,6 °C/min e/ou em que o referido ajustamento da temperatura da solução II à temperatura IV é realizado com uma rampa de temperatura de, pelo menos, 3,6 °C/min.

3. Processo de qualquer uma das reivindicações anteriores, em que a referida solução I compreende um hidróxido de um metal alcalino, de um modo preferido, hidróxido de potássio ou hidróxido de sódio, de um modo muito preferido, hidróxido de sódio, em que a concentração do referido hidróxido é 10 mM a 200 mM, de um modo preferido, cerca de 25 mM, de um modo muito preferido, 25 mM.
4. Processo de qualquer uma das reivindicações anteriores, em que o referido catião é  $\text{Na}^+$  ou  $\text{K}^+$ , em que, de um modo preferido, o referido catião é  $\text{Na}^+$ .
5. Processo de qualquer uma das reivindicações anteriores, em que a concentração do referido oligonucleótido na referida solução I é 50  $\mu\text{M}$  a 2 mM, de um modo muito preferido, 260  $\mu\text{M}$  e/ou em que a concentração do referido oligonucleótido na referida solução II é 50  $\mu\text{M}$  a 2 mM, de um modo preferido, 100 a 300  $\mu\text{M}$ , de um modo muito preferido, 175  $\mu\text{M}$ .
6. Processo de qualquer uma das reivindicações anteriores, em que a referida incubação do referido oligonucleótido na solução II à temperatura III é realizada até que o referido oligonucleótido comporte um tempo de início do pico relativo de 80 a 95%, de um modo preferido, de 80 a 90%, de um modo ainda mais preferido, de 83 a 90%, de um modo ainda mais preferido, de 85 a 90% e, de um modo muito preferido, de 88%.

7. Processo de qualquer uma das reivindicações anteriores, em que o referido oligonucleótido comprehende na sua extremidade 5', pelo menos, 3 e, no máximo, 15 entidades de guanosina e na sua extremidade 3', pelo menos, 3 e, no máximo, 15 entidades de guanosina e em que, de um modo preferido, o referido oligonucleótido comprehende uma sequência palindrómica, em que, de um modo preferido, adicional, a referida sequência palindrómica é GACGATCGTC (SEQ ID N°: 1) e em que, de um modo ainda mais preferido, o referido oligonucleótido comprehende uma sequência de ácidos nucleicos seleccionada do grupo consistindo de:
- (a) "G4-4" GGGGGACGATCGTCGGGG (SEQ ID N°: 2);
  - (b) "G5-5" GGGGGGACGATCGTCGGGGGG (SEQ ID N°: 3);
  - (c) "G6-6" GGGGGGGACGATCGTCGGGGGG (SEQ ID N°: 4);
  - (d) "G7-7" GGGGGGGGACGATCGTCGGGGGGGG (SEQ ID N°: 5);
  - (e) "G8-8" GGGGGGGGGACGATCGTCGGGGGGGG (SEQ ID N°: 6);
  - (f) "G9-9" GGGGGGGGGGACGATCGTCGGGGGGGGGG (SEQ ID N°: 7);
  - (g) "G10" GGGGGGGGGGGACGATCGTCGGGGGGGGGG (SEQ ID N°: 8);
  - (h) "G11" GGGGGGGGGGGGACGATCGTCGGGGGGGGGG (SEQ ID N°: 9).
8. Processo de qualquer uma das reivindicações anteriores, em que o referido oligonucleótido tem a sequência de ácidos nucleicos "G10" GGGGGGGGGGGACGATCGTCGGGGGGGGGG (SEQ ID N°: 8).
9. Processo para a produção de uma composição comprehendendo (i) uma partícula semelhante a vírus, em que a referida partícula semelhante a vírus é uma partícula semelhante a vírus de um bacteriófago de ARN e (ii) um oligonucleótido, em que o referido oligonucleótido está empacotado na

referida partícula semelhante a vírus, o referido processo compreendendo as etapas de:

- (a) proporcionar proteína de revestimento do referido bacteriófago de ARN;
- (b) proporcionar um oligonucleótido,
  - (i) em que o referido oligonucleótido compreende, pelo menos, uma extensão de poli G; e
  - (ii) em que o referido oligonucleótido compreende um tempo de início do pico relativo de 50 a 110%;
- (c) produção de uma mistura, em que a referida mistura compreende:
  - (i) a referida proteína de revestimento, em que, de um modo preferido, a concentração da referida proteína de revestimento na referida mistura é 1 a 4 mg/mL, de um modo mais preferido, 2,5 mg/mL e/ou em que, de um modo preferido, adicional, a concentração do referido oligonucleótido na referida mistura é 25 a 100 µM, de um modo mais preferido, 62,5 µM;
  - (ii) um agente capaz de prevenir o auto-agrupamento da referida proteína de revestimento, em que, de um modo preferido, o referido agente compreende um composto desnaturante seleccionado de ureia e cloridrato de guanidínio, em que, de um modo preferido, adicional, o referido composto desnaturante é ureia e em que, de um modo ainda mais preferido, a concentração da referida ureia na referida mistura é 0,25 a 7,2 M, de um modo preferido, 1 M;
  - (iii) o referido oligonucleótido;

(d) remoção do referido agente da referida mistura, em que, de um modo preferido, a referida remoção do referido agente da referida mistura é realizada por uma primeira troca de tampão com um primeiro tampão, em que o referido primeiro tampão comprehende cloreto de sódio, em que, de um modo preferido, a concentração do referido cloreto de sódio no referido primeiro tampão é 0 a 1 M, de um modo preferido, 0 a 550 mM, de um modo mais preferido, 0 a 350 mM, de um modo ainda mais preferido, 50 a 350 mM e, de um modo muito preferido, 250 mM; e

(e) permitir que a referida proteína de revestimento se auto-agrupa numa partícula semelhante a vírus.

10. Processo da reivindicação 9, em que a referida proteína de revestimento comprehende ou, alternativamente, consiste essencialmente ou alternativamente consiste de proteínas recombinantes, ou os seus fragmentos, de um bacteriófago de ARN, em que, de um modo preferido, o referido bacteriófago de ARN é seleccionado do grupo consistindo de:

- (a) bacteriófago Q $\beta$ ;
- (b) bacteriófago R17;
- (c) bacteriófago fr;
- (d) bacteriófago GA;
- (e) bacteriófago SP;
- (f) bacteriófago M11;
- (g) bacteriófago MX1;
- (h) bacteriófago NL95;
- (i) bacteriófago f2;
- (j) bacteriófago PP7; e
- (k) bacteriófago AP205.

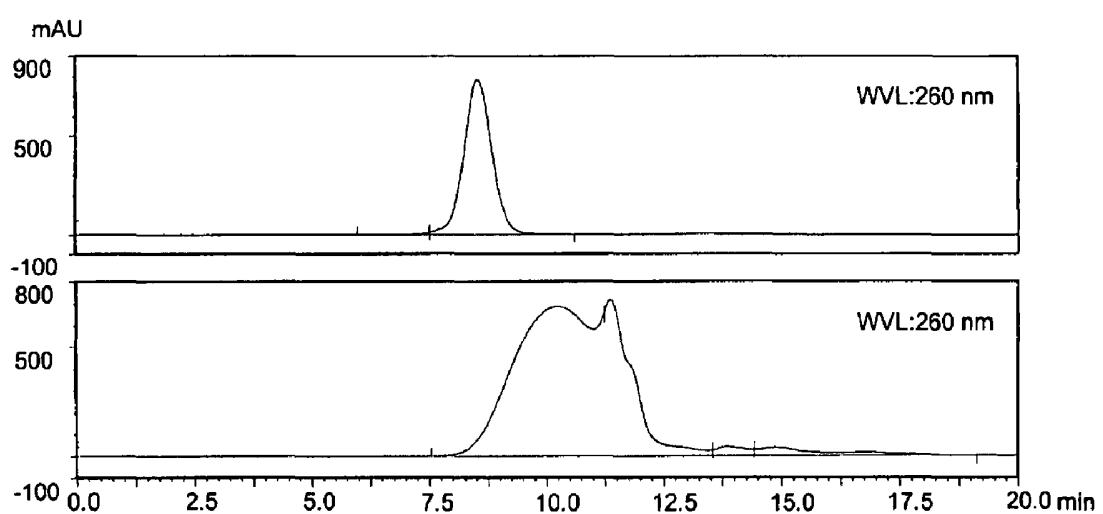
11. Processo da reivindicação 9, em que o referido bacteriófago de ARN é Q $\beta$ .
12. Processo da reivindicação 11, em que a razão molar do referido oligonucleótido e referida proteína de revestimento na referida mistura é 0,5 a 1,2, de um modo muito preferido, 0,7.
13. Processo da reivindicação 9, em que a referida proteína de revestimento compreende ou, de um modo preferido, consiste na sequência seleccionada do grupo consistindo de:
  - (a) SEQ ID N°: 10 (CP de Q $\beta$ );
  - (b) uma mistura de SEQ ID N°: 10 e SEQ ID N°: 11 (proteína A1 de Q $\beta$ );
  - (c) SEQ ID N°: 12 (proteína de revestimento de R17);
  - (d) SEQ ID N°: 13 (proteína de revestimento de fr);
  - (e) SEQ ID N°: 14 (proteína de revestimento de GA);
  - (f) SEQ ID N°: 15 (proteína de revestimento de SP);
  - (g) uma mistura de SEQ ID N°: 15 e SEQ ID N°: 16;
  - (h) SEQ ID N°: 17 (proteína de revestimento de MS2);
  - (i) SEQ ID N°: 18 (proteína de revestimento de M11);
  - (j) SEQ ID N°: 19 (proteína de revestimento de MX1);
  - (k) SEQ ID N°: 20 (proteína de revestimento de NL95);
  - (l) SEQ ID N°: 21 (proteína de revestimento de f2);
  - (m) SEQ ID N°: 22 (proteína de revestimento de PP7); e
  - (n) SEQ ID N°: 23 (proteína de revestimento de AP205).
14. Processo de qualquer uma das reivindicações 9 a 13, em que o referido oligonucleótido compreende uma sequência palindrómica, em que a referida sequência palindrómica é GACGATCGTC (SEQ ID N°: 1) e em que a referida sequência

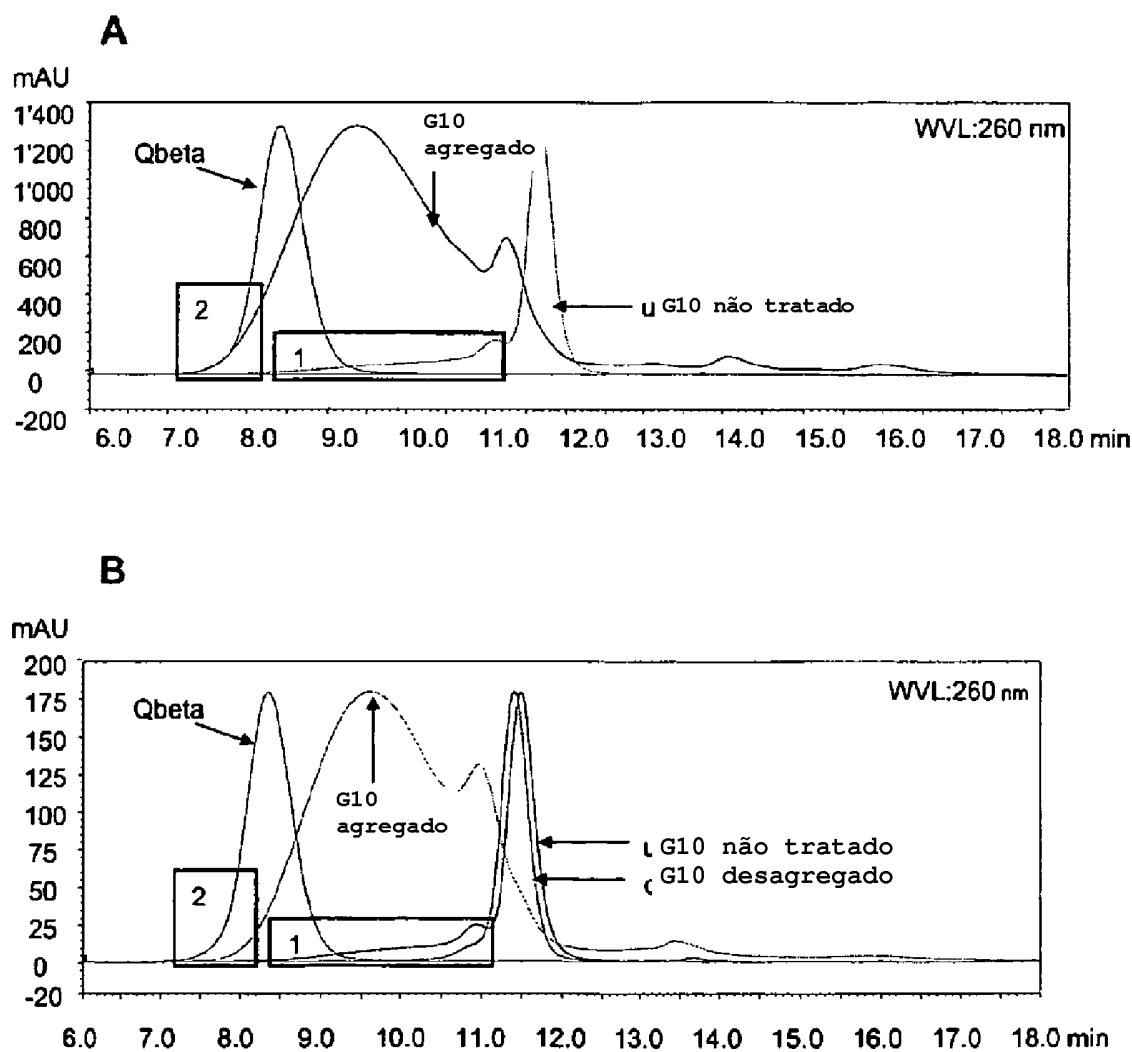
palindrómica está flanqueada na sua extremidade 5' por, pelo menos, 3 e, no máximo, 15 entidades de guanosina e em que a referida sequência palindrómica está flanqueada na sua extremidade 3' por, pelo menos, 3 e, no máximo, 15 entidades de guanosina e em que, de um modo preferido, o referido oligonucleótido comprehende uma sequência de ácidos nucleicos seleccionada do grupo consistindo de:

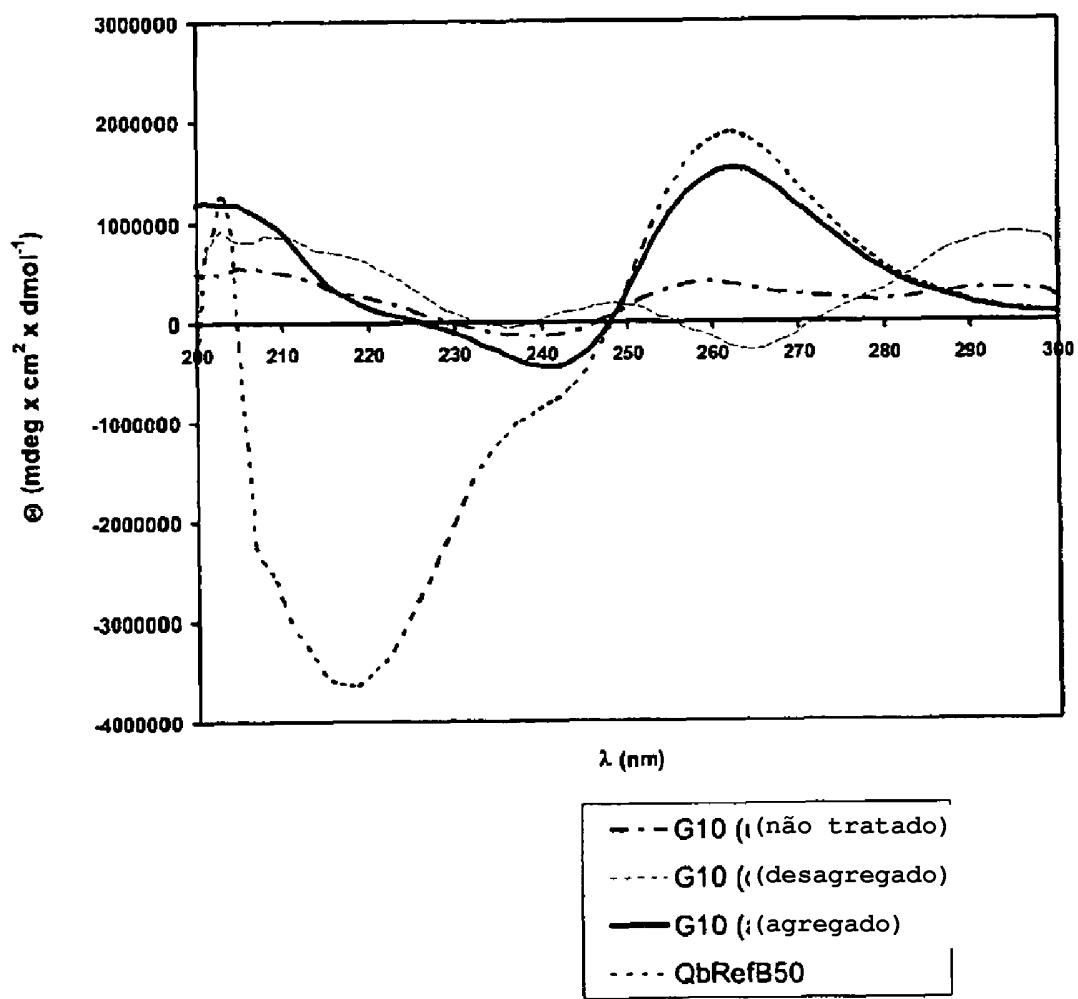
- (a) "G4-4" GGGGGACGATCGTCGGGG (SEQ ID N°: 2);
- (b) "G5-5" GGGGGGACGATCGTCGGGGG (SEQ ID N°: 3);
- (c) "G6-6" GGGGGGGACGATCGTCGGGGGG (SEQ ID N°: 4);
- (d) "G7-7" GGGGGGGGACGATCGTCGGGGGGG (SEQ ID N°: 5);
- (e) "G8-8" GGGGGGGGGACGATCGTCGGGGGGGG (SEQ ID N°: 6);
- (f) "G9-9" GGGGGGGGGGACGATCGTCGGGGGGGG (SEQ ID N°: 7);
- (g) "G10" GGGGGGGGGGACGATCGTCGGGGGGGG (SEQ ID N°: 8);
- (h) "G11" GGGGGGGGGGGACGATCGTCGGGGGGGG (SEQ ID N°: 9).

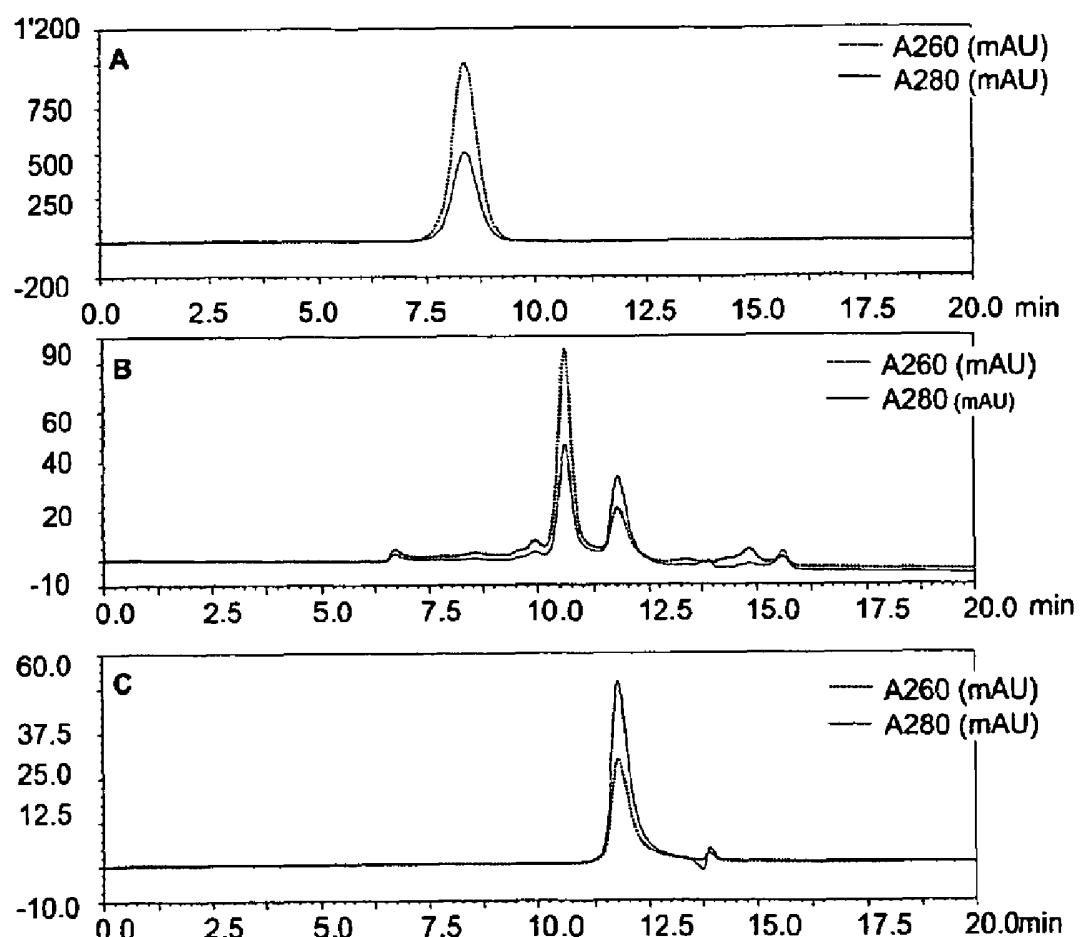
15. Processo de qualquer uma das reivindicações 9 a 14, em que o rendimento de proteína é, pelo menos, 75% e/ou em que o rendimento de oligonucleótido é, pelo menos, 75%.

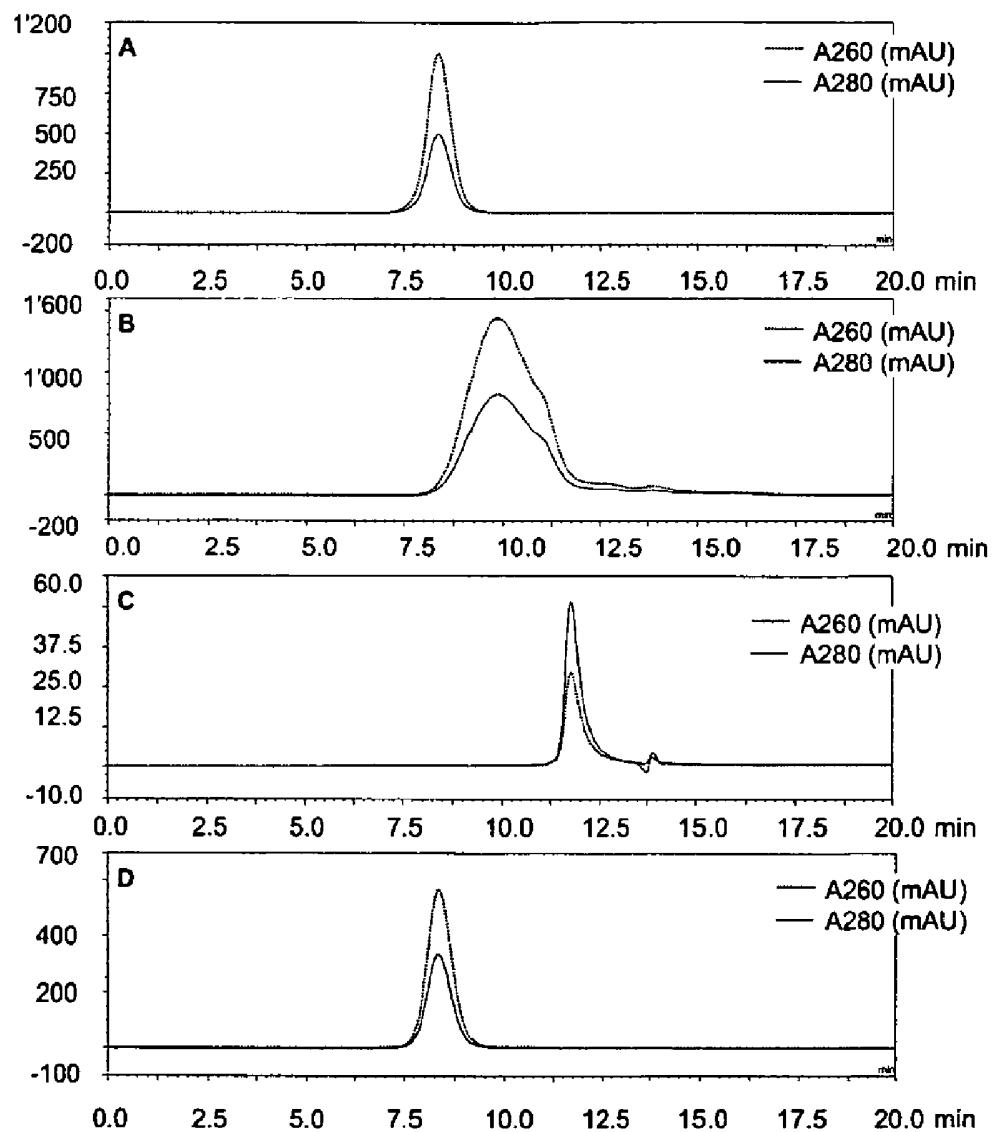
Lisboa, 20 de Agosto de 2013

**Figura 1**

**Figura 2**

**Figura 3**

**Figura 4**

**Figura 5**

**Figura 6**

