

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 633 246**

51 Int. Cl.:

A61K 39/00

(2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **08.10.2008** **PCT/EP2008/008504**

87 Fecha y número de publicación internacional: **16.04.2009** **WO09046975**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **08.10.2008** **E 08802829 (5)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **12.04.2017** **EP 2195015**

54 Título: **Composición para el tratamiento del cáncer de próstata (PCa)**

30 Prioridad:

09.10.2007 WO PCT/EP2007/008771

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

20.09.2017

73 Titular/es:

**CUREVAC GMBH (100.0%)
PAUL-EHRLICH-STR. 15
72076 TUBINGEN, DE**

72 Inventor/es:

**PROBST, JOCHEN;
HOERR, INGMAR y
LANDER, THOMAS**

74 Agente/Representante:

AZNÁREZ URBIETA, Pablo

Observaciones:

Véase nota informativa (Remarks, Remarques o Bemerkungen) en el folleto original publicado por la Oficina Europea de Patentes

ES 2 633 246 T3

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

DESCRIPCIÓN

Composición para el tratamiento del cáncer de próstata (PCa)

La presente invención se refiere a una composición inmunoestimuladora activa que comprende cuatro ARN, preferiblemente ARNm, que codifican al menos cuatro antígenos diferentes capaces de provocar una respuesta inmunitaria (adaptativa) en un mamífero, seleccionándose los antígenos entre el grupo consistente en PSA (antígeno prostático específico), PSMA (antígeno de membrana específico de próstata), PSCA (antígeno de células madre de próstata) y STEAP (antígeno epitelial de seis dominios transmembrana de la próstata). La invención se refiere además a una vacuna que comprende dicha composición inmunoestimuladora activa y al uso de dicha composición inmunoestimuladora activa para la preparación de una vacuna y/o de la vacuna para provocar una respuesta inmunitaria (adaptativa) para el tratamiento del cáncer de próstata (PCa), preferiblemente de cánceres de próstata refractarios a la terapia neoadyuvante y/u hormonal, y enfermedades o afecciones relacionadas con éstos. Por último, la invención se refiere a *kits*, en particular *kits* de partes, que contienen cuatro ARN, que codifican cada uno un antígeno diferente tal como se menciona más arriba.

Actualmente, el cáncer de próstata es el segundo cáncer diagnosticado con mayor frecuencia y la cuarta causa principal de muerte relacionada con cáncer en hombres en los países desarrollados de todo el mundo. Las modalidades de tratamiento curativo eficaces son debilitantes y actualmente solo están disponibles para enfermedades localizadas. En el cáncer de próstata refractario al tratamiento hormonal, ningún agente ha demostrado prolongar la supervivencia más allá de aproximadamente 1 año (véase, por ejemplo, Pavlenko, M., A. K. Roos, et al. (2004). "A phase I trial of DNA vaccination with a plasmid expressing prostate-specific antigen in patients with hormone-refractory prostate cancer." *Br J Cancer* 91(4): 688-94). En algunos países occidentales altamente desarrollados, como en Estados Unidos, el cáncer de próstata es actualmente incluso el tumor maligno más frecuente y la tercera causa principal de muerte relacionada con cáncer entre los hombres estadounidenses (véase, por ejemplo, Jemal, A., R. Siegel, et al. (2006). "Cancer statistics, 2006." *CA Cancer J Clin* 56(2): 106-30) y en Europa, respectivamente (véase, por ejemplo, Thomas-Kaskel, A. K., C. F. Waller, et al. (2007). "Immunotherapy with dendritic cells for prostate cancer." *Int J Cancer* 121(3): 467-73). La mayor parte de los tumores diagnosticados son adenocarcinomas que inicialmente proliferan de forma hormonalmente dependiente. El cáncer de próstata es una enfermedad en la que el cáncer se desarrolla en la próstata, una glándula del sistema reproductor masculino. Se produce cuando células de la próstata mutan y comienzan a multiplicarse sin control. Los antígenos típicos que se ha demostrado que son sobreexpresados por células de cáncer de próstata en comparación con células de próstata normales son, entre otros, antígenos como PSA, PSMA, PAP, PSCA, HER-2 y Ep-CAM. Estas células de cáncer de próstata se pueden propagar (metastatizar) desde la próstata a otras partes del cuerpo, en especial a los huesos y ganglios linfáticos. El cáncer de próstata puede provocar dolor, dificultad para orinar, disfunción eréctil y otros síntomas. Normalmente, el cáncer de próstata se desarrolla más frecuentemente en hombres mayores de cincuenta años, que representan el grupo de pacientes más común. Sin embargo, el cáncer de próstata casi siempre permanece sin ser descubierto, incluso aunque la determinación fuera posible. La determinación del cáncer de próstata se produce normalmente en un examen físico o mediante análisis de sangre de rastreo, como análisis de PSA (antígeno prostático específico). Cuando existen sospechas de cáncer de próstata, el cáncer normalmente se confirma extrayendo un trozo de la próstata (biopsia) y examinándolo al microscopio. Para determinar si el cáncer de próstata se ha propagado se pueden realizar otros exámenes, como rayos X y escáneres óseos.

El tratamiento del cáncer de próstata sigue siendo un desafío no resuelto. Para el tratamiento del cáncer de próstata se pueden aplicar métodos terapéuticos convencionales, como cirugía, radioterapia, terapia hormonal, ocasionalmente quimioterapia, o alguna combinación de éstas. Sin embargo, la edad y la salud subyacente del hombre, así como la extensión de la propagación, el aspecto bajo el microscopio y la respuesta del cáncer al tratamiento inicial son importantes para determinar el resultado de la enfermedad. Dado que el cáncer de próstata es una enfermedad normalmente diagnosticada en relación con hombres mayores, muchos morirán de otras causas antes de que un cáncer de próstata de avance lento se pueda propagar o causar síntomas. Esto dificulta

la selección del tratamiento. La decisión de tratar o no un cáncer de próstata localizado (un tumor contenido dentro de la próstata) con fines curativos es un compromiso de los pacientes entre los efectos beneficiosos y nocivos previstos en términos de supervivencia y calidad de vida del paciente.

5 Sin embargo, todos los métodos terapéuticos arriba indicados, tales como cirugía, radioterapia, terapia hormonal y quimioterapia, adolecen de graves limitaciones. Por ejemplo, la extirpación quirúrgica de la próstata, o prostatectomía, es un tratamiento común bien para el cáncer de próstata en etapa temprana, bien para el cáncer que no ha respondido a la radioterapia. Puede causar lesiones nerviosas que alteran significativamente la calidad de vida. Las complicaciones graves más comunes son la pérdida de control urinario e impotencia. Sin embargo, aunque se pueda eliminar con éxito el cáncer de próstata, la propagación del cáncer de próstata por todo el organismo sigue siendo un problema sin resolver.

10 En el tratamiento del cáncer de próstata habitualmente se aplica radioterapia. Puede emplearse ésta en lugar de la cirugía en caso de cánceres tempranos y también en etapas avanzadas del cáncer de próstata, para tratar metástasis óseas dolorosas. Los tratamientos con radiación también se pueden combinar con terapias hormonales en caso de enfermedad de riesgo intermedio, cuando es menos probable que la radioterapia sola cure el cáncer. No obstante, la radioterapia también implica grandes riesgos y con frecuencia conduce a una pérdida completa de las defensas inmunitarias, debido a la destrucción del sistema inmunitario del paciente. Además, normalmente, la radioterapia se aplica localmente en el lugar del desarrollo del cáncer y, por tanto, no puede evitar el problema arriba indicado de la propagación del cáncer de próstata por todo el organismo. Si se aplica de forma sistémica, la radioterapia puede conducir a daños graves en las células y el sistema inmunitario.

20 La quimioterapia ha sido considerada durante mucho tiempo como un tipo de tratamiento poco eficaz para los cánceres de próstata, ya que únicamente muy pocos pacientes responden a este tipo de terapia. Sin embargo, algunos pacientes (respondedores) que tienen carcinoma de próstata metastásico se pueden beneficiar de la quimioterapia. La tasa de respuesta es de aproximadamente un 20% y, por tanto, la quimioterapia desempeñará un papel durante el tratamiento de la recidiva tumoral y cuando falle la terapia hormonal. Sin embargo, la quimioterapia normalmente solo será paliativa y no conduce a una eliminación total del cáncer de próstata del paciente. Agentes quimioterapéuticos típicos incluyen ciclofosfamida, doxorubicina, 5-fluorouracilo, adriamicina, suramina y otros agentes, sin embargo, ninguno de éstos ha posibilitado una supervivencia significativamente mayor de los pacientes. En un estudio reciente, publicado en 2004 en el New England Journal of Medicine, se ha podido demostrar una mayor supervivencia en un promedio de 2,5 meses en caso de pacientes que recibieron una dosis del agente docetaxel cada tres semanas.

30 La terapia hormonal normalmente emplea medicaciones o una combinación de terapia hormonal con cirugía para impedir que las células del cáncer de próstata obtengan dihidrotestosterona (DHT), una hormona producida en la próstata y necesaria para el crecimiento y la propagación de la mayoría de las células de cáncer de próstata. Con frecuencia, el bloqueo de la DHT hace que el cáncer de próstata se detenga e incluso disminuya. Sin embargo, la terapia hormonal raras veces cura el cáncer de próstata, ya que los cánceres que responden inicialmente a la terapia hormonal normalmente se vuelven resistentes después de uno a dos años. Por ejemplo, una terapia paliativa de privación de andrógenos puede inducir remisiones hasta en un 80% de los pacientes, pero después de 15-20 meses, las células tumorales se vuelven insensibles a las hormonas y se desarrolla un cáncer de próstata andrógeno-independiente. En esta situación, las opciones de tratamiento son escasas, ya que la quimioterapia tiene una eficacia limitada (véase más arriba). Por tanto, la terapia hormonal normalmente se utiliza cuando el cáncer se ha propagado desde la próstata. También se puede administrar a determinados hombres sometidos a radioterapia o cirugía para evitar que reaparezca su cáncer.

40 Por ello, existe la necesidad de estrategias de tratamiento alternativas para pacientes de cáncer de próstata normal y también con cáncer de próstata recurrente o avanzado. Como estrategia, las terapias estándar arriba descritas utilizadas para el cáncer de próstata limitado a un órgano, incluyendo prostatectomía radical o radioterapia tal como radiación por (haz) externo y braquiterapia, también pueden incorporar en algunas circunstancias terapia hormonal neoadyuvante o adyuvante (véase, por ejemplo, Totterman, T. H., A. Loskog, et al. (2005). "The immunotherapy of prostate and bladder cancer." BJU Int 96(5): 728-35). Mientras que estas

terapias son relativamente eficaces a corto plazo, una proporción significativa (30-40%) de los pacientes que tienen una enfermedad inicialmente localizada finalmente recaerán. La terapia principal para el cáncer de próstata metastásico es la ablación androgénica. Si bien usualmente esto proporciona citorreducción y paliación, normalmente se produce una progresión a enfermedad refractaria al tratamiento hormonal en un plazo de 14-20 meses. En el campo de la quimioterapia se han presentado muchos estudios clínicos referentes al cáncer de próstata andrógeno-independiente avanzado. Solo recientemente, dos ensayos han revelado que la quimioterapia mejora marginalmente la supervivencia general de pacientes con enfermedad refractaria al tratamiento hormonal.

Resumiendo lo anterior, técnicas estándar tales como la cirugía arriba mencionada, radioterapia, terapia hormonal, ocasionalmente quimioterapia, terapia de protones, etc., si se aplican solas, no parecen ser adecuadas para un tratamiento eficiente del cáncer de próstata (PCa). Por consiguiente, un modo mejorado de tratamiento puede incluir tratamientos o tratamientos suplementarios que puedan complementar estas técnicas estándar. Así, aquí se propone utilizar el sistema inmunitario adaptativo en una estrategia para el tratamiento o el tratamiento suplementario del cáncer de próstata (PCa).

Como es sabido en la técnica, el sistema inmunitario desempeña un papel importante en el tratamiento y la prevención de numerosas enfermedades. De acuerdo con el estado actual del conocimiento, los mamíferos disponen de varios mecanismos para proteger el organismo identificando y matando, por ejemplo, células tumorales. Para los objetivos de la presente invención, estas células tumorales deben ser detectadas y distinguidas de las células y tejidos normales (sanos) del organismo.

El sistema inmunitario de los vertebrados, como el ser humano, consiste en muchos tipos de proteínas, células, órganos y tejidos que interactúan en una red elaborada y dinámica. Como parte de esta respuesta inmunitaria compleja, el sistema de los vertebrados se adapta con el tiempo para reconocer patógenos particulares o células tumorales de forma más eficaz. El proceso de adaptación crea memorias inmunológicas y permite una protección incluso más eficaz durante futuros encuentros. Este proceso de inmunidad adaptativa o adquirida es la base de las estrategias de vacunación.

El sistema inmunitario adaptativo es específico de antígenos y requiere el reconocimiento de "autoantígenos" o "no autoantígenos" específicos durante un proceso denominado presentación de antígenos. La especificidad de antígenos permite generar respuestas adaptadas a patógenos específicos o a células infectadas por patógenos o a células tumorales. Unas llamadas "células de memoria" mantienen la capacidad de proporcionar estas respuestas adaptadas en el cuerpo. Si un patógeno infecta el cuerpo más de una vez, se utilizan estas células de memoria específicas para eliminarlo rápidamente. Por tanto, el sistema inmunitario adaptativo posibilita una respuesta inmunitaria más fuerte, así como una memoria inmunológica en la que cada patógeno o célula tumoral es "recordado" por uno o más antígenos "de firma".

Los componentes principales del sistema inmunitario adaptativo en vertebrados incluyen predominantemente linfocitos a nivel celular y anticuerpos a nivel molecular. Los linfocitos como componentes celulares del sistema inmunitario adaptativo incluyen células B y células T derivadas de células madre hematopoyéticas de la médula ósea. Las células B intervienen en la respuesta humoral, mientras que las células T intervienen en la respuesta inmunitaria mediada por células. Tanto las células B como las células T portan moléculas receptoras que reconocen dianas específicas. Las células T reconocen una diana "no propia", tal como una estructura diana patógena, únicamente después de que antígenos (por ejemplo pequeños fragmentos de un patógeno) hayan sido procesados y presentados en combinación con un receptor "propio", denominado molécula de complejo principal de histocompatibilidad (MHC). En cambio, el receptor específico de antígeno de células B es una molécula de anticuerpo sobre la superficie de la célula B y reconoce los patógenos como tales cuando anticuerpos sobre su superficie se unen a un antígeno extraño específico. Este complejo antígeno/anticuerpo es absorbido por la célula B y procesado mediante proteólisis en péptidos. Después, la célula B muestra estos péptidos antigénicos sobre sus moléculas de MHC de clase II superficiales. Esta combinación de MHC y antígeno atrae una célula T auxiliar correspondiente que libera linfoquinas y activa la célula B. Cuando la célula B activada comienza a dividirse, su descendencia segrega millones de copias del anticuerpo que reconoce este antígeno.

Estos anticuerpos circulan en el plasma sanguíneo y la linfa, se unen a patógenos o células tumorales que expresan el antígeno y las marcan para su destrucción mediante activación de complemento o para la absorción y destrucción por fagocitos. Como un componente celular del sistema inmunitario adaptativo, las células T citotóxicas (CD8⁺) también pueden proporcionar una respuesta de CTL. Las células T citotóxicas (CD8⁺) pueden reconocer péptidos de patógenos endógenos y autoantígenos unidos por moléculas de MHC de tipo I. Las células CD8⁺-T desempeñan su función letal liberando proteínas citotóxicas en la célula.

Así, algunos mecanismos del sistema inmunitario pueden formar dianas para tratamientos curativos de diversas enfermedades. Los métodos apropiados se basan normalmente en la administración de antígenos o inmunógenos con el fin de provocar una respuesta inmunitaria adaptativa. Dado que los antígenos se basan normalmente en componentes específicos de patógenos (por ejemplo proteínas de superficie) o fragmentos de los mismos, también está prevista la administración de ácidos nucleicos al paciente seguida por la expresión de los polipéptidos, proteínas o antígenos deseados.

Por ejemplo, en Noguchi *et al.* (2003) y (2004) (véase e.g. Noguchi, M., K. Itoh, et al. (2004). "Phase I trial of patient-oriented vaccination in HLA-A2-positive patients with metastatic hormone-refractory prostate cancer." *Cancer Sci* 95(1): 77-84; y Noguchi, M., K. Kobayashi, et al. (2003). "Induction of cellular and humoral immune responses to tumor cells and peptides in HLA-A24 positive hormone-refractory prostate cancer patients by peptide vaccination." *Prostate* 57(1): 80-92. Noguchi *et al.* 2003 y Noguchi *et al.* 2004) se llevaron a cabo estudios de vacunación basados en antígenos conocidos relacionados con la próstata. Noguchi *et al.* (2003) y (2004) llevaron a cabo dos estudios de fase I con un ensayo de vacunación con multipéptidos en pacientes de cáncer de próstata metastásico resistente al tratamiento hormonal que mostraban respuestas inmunitarias celulares y humorales incrementadas a dianas seleccionadas. La estrategia de vacunación era segura, bien tolerada, sin ningún efecto tóxico importante. No obstante, también se observó una estabilización o reducción de los niveles de antígeno prostático específico (PSA) y únicamente un paciente mostró desaparición de una metástasis ósea. La limitación principal de esta estrategia que dificulta las aplicaciones clínicas se basa en la necesidad de un conocimiento *a priori* del haplotipo HLA del paciente, así como de la expresión de los péptidos por las células del cáncer de próstata.

Algunas otras propuestas recientes utilizan estrategias de vacunación basadas en células, por ejemplo el uso de diferentes antígenos en estrategias de vacunación o el uso de células dendríticas cargadas con diferentes antígenos o fragmentos de los mismos. De acuerdo con un ejemplo, la vacunación de pacientes de cáncer de próstata ha sido probada en ensayos clínicos con células dendríticas autólogas pulsadas con PSA humano recombinante (véase, por ejemplo, Barrou, B., G. Benoit, et al. (2004). "Vaccination of prostatectomized prostate cancer patients in biochemical relapse, with autologous dendritic cells pulsed with recombinant human PSA." *Cancer Immunol Immunother* 53(5): 453-60). Durante la vacunación de pacientes de cáncer de próstata avanzado con células dendríticas cargadas con péptidos PSCA y PSA, de 5 a 10 pacientes mostraron una respuesta inmunitaria contra al menos un antígeno (véase, por ejemplo, Thomas-Kaskel, A. K., R. Zeiser, et al. (2006). "Vaccination of advanced prostate cancer patients with PSCA and PSA peptide-loaded dendritic cells induces DTH responses that correlate with superior overall survival." *Int J Cancer* 119(10): 2428-34).

En otro ejemplo, Murphy *et al.* (1996) llevaron a cabo una vacunación de pacientes de cáncer de próstata en un ensayo de fase I correspondiente con dos epítomos PSMA HLA-A*0201 para comparar la vacunación solo con péptido o con DC pulsadas. Los resultados mostraron que respondían más pacientes a la vacunación si éstos eran vacunados con DC pulsadas. Este estudio mostró que la vacunación con DC cargadas con péptidos o proteínas conduce al menos parcialmente a respuestas inmunitarias detectables y a una disminución o estabilización temporal de PSC (véase, por ejemplo, Murphy, G., B. Tjoa, et al. (1996). "Phase I clinical trial: T-cell therapy for prostate cancer using autologous dendritic cells pulsed with HLA-A0201-specific peptides from prostate-specific membrane antigen." *Prostate* 29(6): 371-80).

La vacunación de pacientes de cáncer de próstata también se puede llevar a cabo con combinaciones de péptidos cargadas en células dendríticas, por ejemplo con células dendríticas cargadas con un cóctel peptídico (véase, por ejemplo, Fuessel, S., A. Meye, et al. (2006). "Vaccination of hormone-refractory prostate cancer

patients with peptide cocktail-loaded dendritic cells: results of a phase I clinical trial." *Prostate* 66(8): 811-21). El cóctel contenía péptidos de PSA, PSMA, Survivina, Prosteína y Trp-p8 (receptor de potencial transitorio p8). También se llevaron a cabo ensayos clínicos con una inmunoterapia multiepítipo basada en células dendríticas de carcinoma de próstata refractario a la terapia hormonal (véase, por ejemplo, Waeckerle-Men, Y., E. Uetz-von Allmen, et al. (2006). "Dendritic cell- based multi-epitope immunotherapy of hormone-refractory prostate carcinoma." *Cancer Immunol Immunother* 55(12): 1524-33). Waeckerle-Men, Y., E. Uetz-von Allmen, et al. (2006) ensayaron la vacunación de carcinoma de próstata refractario a la terapia hormonal con péptidos de PSCA, PAP (fosfatasa ácida prostática), PSMA y PSA.

Yang et al. (*Cancer Research* 61, 5857 - 5860, 2001) proponen nuevas herramientas (mPSCA, mSTEAP y mPSMA) para la construcción de vacunas preventivas y/o terapéuticas y control inmunitario en el modelo de ratón TRAMP.

Se ha comprobado que STEAP es un antígeno de superficie celular específico de próstata altamente expresado en tumores de próstata humanos (Hubert et al., *PNAS*, Vol. 96, Nº 25, 14523 - 14528, 1999), lo que sugiere STEAP como una diana de antígeno tumoral para la terapia del cáncer de próstata.

Aunque la vacunación con proteínas o péptidos antigénicos, por ejemplo cuando se cargan en células dendríticas, es un método común para provocar una respuesta inmunitaria, la inmunización o vacunación también se puede basar en el uso de ácidos nucleicos para incorporar la información genética requerida en la célula. En general se han desarrollado diversos métodos para introducir ácidos nucleicos en células, tales como transfección de fosfato de calcio, transfección de polipreno, fusión de protoplastos, electroporación, microinyección y lipofección, demostrándose en particular la lipofección como método adecuado.

De acuerdo con un ejemplo, el tratamiento del cáncer de próstata mediante vacunación se puede basar en la transfección de ARNm total derivado del tumor autólogo en DC (véase Heiser et al. (2002) (véase, por ejemplo, Heiser, A., D. Coleman, et al. (2002). "Autologous dendritic cells transfected with prostate-specific antigen RNA stimulate CTL responses against metastatic prostate tumors." *J Clin Invest* 109(3): 409-17.). Esta estrategia tiene la ventaja de dirigir múltiples antígenos asociados a tumor (AAT) específicos de pacientes de HLA de clase I y clase II sin tipificación previa de los HLA. Además, mediante esta estrategia se pudieron dirigir incluso antígenos estromales, ya que el ARNm se obtenía de muestras quirúrgicas y no de líneas de células tumorales. Por ejemplo, Heiser et al. desarrollaron un protocolo de inmunoterapia basado en DC en el que las DC se transfectaban con PSA codificador de ARNm. La vacunación era bien tolerada e inducía un aumento de la respuesta de células T al PSA. Sin embargo, dichas vacunas anticáncer de próstata basadas en DC parecen generar una fuerte respuesta de las células T, que puede estar acompañada de una respuesta clínica, aunque la frecuencia de esta última sigue siendo insatisfactoria.

También se puede utilizar ADN como ácido nucleico en estrategias de vacunación con el fin de incorporar la información genética requerida en la célula. De acuerdo con un ejemplo específico, se pueden utilizar ADN-virus como vehículo de ADN. Debido a sus propiedades infecciosas, estos virus alcanzan una tasa de transfección muy alta. Los virus utilizados se modifican de tal modo que no se formen partículas infecciosas funcionales en la célula transfectada. Por ejemplo, se llevaron a cabo ensayos en fase I en un estudio de Eder et al. (2000) utilizando virus de vacuna recombinante que expresan PSA. Los autores demostraron respuestas inmunitarias de células T al PSA y también estabilizaciones de PSA en suero en pacientes seleccionados (véase, por ejemplo, Eder, J. P., P. W. Kantoff, et al. (2000). "A phase I trial of a recombinant vaccinia virus expressing prostate-specific antigen in advanced prostate cancer." *Clin Cancer Res* 6(5): 1632-8.). La respuesta inflamatoria provocada por los péptidos altamente inmunógenos del virus recombinante puede aumentar la inmunogenicidad de la proteína extraña, pero se demostró que el sistema inmunitario reduce la replicación del virus recombinante y limita así el resultado clínico. Aunque algunas vacunas recombinantes han mostrado inmunogenicidad y diversos ensayos han mostrado pruebas de una respuesta tumoral, estos resultados deben ser corroborados.

De acuerdo con otra estrategia se llevó a cabo una vacunación de pacientes de cáncer de próstata refractario al tratamiento hormonal con plásmidos de ADN que expresan PSA (véase, por ejemplo, Pavlenko, M., A. K. Roos, et al. (2004). "A phase I trial of DNA vaccination with a plasmid expressing prostate-specific antigen in patients

with hormone-refractory prostate cancer." *Br J Cancer* 91(4): 688-94). Garcia-Hernandez *et al.* (2007) demostraron que la vacunación terapéutica y profiláctica con un plásmido o con un replicón similar a virus que codifica STEAP (antígeno epitelial de seis dominios transmembrana de la próstata) prolongó la supervivencia en ratones estimulados con tumor (véase, por ejemplo, Garcia-Hernandez Mde, L., A. Gray, et al. (2007). "In vivo effects of vaccination with six-transmembrane epithelial antigen of the prostate: a candidate antigen for treating prostate cancer." *Cancer Res* 67(3): 1344-51). Recientemente, el STEAP ha sido identificado como proteína indicadora de cáncer de próstata humano avanzado, que es altamente sobreexpresada en cáncer de próstata humano. Su función es actualmente desconocida.

- 10 Sin embargo, cuando se utiliza ADN como soporte de información genética, no es posible excluir el riesgo de una propagación incontrolada del gen introducido o de genes virales, por ejemplo debido a eventos de recombinación potenciales. Esto también implica el riesgo de que el ADN se inserte en un gen intacto del genoma de la célula huésped, por ejemplo por recombinación, con la consecuencia de que este gen puede mutar y resultar así completa o parcialmente inactivado, o el gen puede dar lugar a información errónea. En otras palabras, la
- 15 síntesis de un producto genético vital para la célula puede ser suprimida por completo o alternatively se expresa un producto genético modificado o incorrecto. Existe un riesgo particular cuando el ADN se integra en un gen que interviene en la regulación del crecimiento celular. En este caso, la célula huésped se puede degenerar y conducir a cáncer o a formación de tumores. Además, si el ADN introducido en la célula debe expresarse, es necesario que el vehículo de ADN correspondiente contenga un promotor fuerte, tal como el
- 20 promotor CMV viral. La integración de estos promotores en el genoma de la célula tratada puede conducir a alteraciones no deseadas de la regulación de la expresión genética en la célula. Otro riesgo de la utilización de ADN como agente para inducir una respuesta inmunitaria (por ejemplo como una vacuna) es la inducción de anticuerpos anti-ADN patógenos en el paciente al que se ha introducido el ADN extraño, provocando así una respuesta inmunitaria (posiblemente fatal).

- 25 El documento WO 2006/008154 describe la vacunación con ARNm para varios ARN que codifican una gran variedad de antígenos.

Resumiendo los resultados de las estrategias arriba descritas, es indudable que se ha logrado una cierta mejora en el tratamiento del cáncer de próstata (PCa), aunque, dadas las altas tasas de mortalidad, sigue existiendo una gran necesidad de otros métodos de tratamiento alternativos o mejorados.

- 30 Por tanto, en conjunto existe un espacio para un sistema eficiente, y una necesidad del mismo, que pueda utilizarse para estimular eficazmente el sistema inmunitario con el fin de posibilitar el tratamiento del cáncer de próstata (PCa) a la vez que se evitan los problemas de una propagación incontrolada de un gen introducido debido a las composiciones basadas en ADN.

- 35 Por consiguiente, un objeto de la presente invención es proporcionar una composición que a) posibilite el tratamiento del cáncer de próstata (PCa) mediante estimulación del sistema inmunitario, mientras que b) se evitan las desventajas arriba mencionadas.

Este objeto se resuelve mediante la materia en cuestión de la presente invención, en particular mediante una composición inmunoestimuladora activa que comprende cuatro ARN, que codifican cada uno un antígeno diferente seleccionado de entre el grupo de los siguientes antígenos:

- 40
- PSA (antígeno prostático específico) = KLK3 (calicreína-3),
 - PSMA (antígeno de membrana específico de próstata),
 - PSCA (antígeno de células madre de próstata),
 - STEAP (antígeno epitelial de seis dominios transmembrana de la próstata).

- 45 Sorprendentemente, se ha comprobado que una combinación específica de al menos cuatro antígenos, proteínas antigénicas o péptidos antigénicos del grupo arriba mencionado, contenida dentro de una composición inmunoestimuladora activa de acuerdo con la presente invención, puede estimular eficazmente el sistema

inmunitario (adaptativo) para posibilitar el tratamiento del cáncer de próstata (PCa), preferiblemente de cánceres de próstata refractarios a la terapia neoadyuvante y/u hormonal, y enfermedades o afecciones relacionadas con éstos. Aquí, los conceptos antígenos, proteínas antigénicas o péptidos antigénicos pueden utilizarse como sinónimos. En el contexto de la presente invención, una composición inmunoestimuladora activa de la invención se debe entender además como una composición capaz de provocar una respuesta inmunitaria, preferiblemente una respuesta inmunitaria adaptativa tal como se define aquí, debido a uno de los componentes contenidos o codificados por los componentes de la composición inmunoestimuladora activa, preferiblemente mediante los al menos cuatro ARN, preferiblemente ARN(m), que codifican los al menos cuatro antígenos diferentes.

Se ha demostrado que los antígenos tales como PSA, PSMA y PSCA son sobreexpresados por células de cáncer de próstata en comparación con células de próstata normales. Por tanto, estos antígenos representan posibles dianas de inmunoterapia (véase, por ejemplo, Marrari, A., M. Iero, et al. (2007). "Vaccination therapy in prostate cancer." *Cancer Immunol Immunother* 56(4): 429-45).

Uno de los al menos cuatro ARN de la composición inmunoestimuladora activa codifica PSA. En el contexto de esta invención, "PSA" es "antígeno prostático específico" y en la literatura puede denominarse con su sinónimo KLK3 (calicreína-3). El antígeno prostático específico (PSA) es una proteína de 33 kDa y una serina proteasa similar a calicreína regulada por andrógeno que es producida exclusivamente por las células epiteliales de todos los tipos de tejido prostático, benigno y maligno. En particular, el PSA es altamente expresado por células epiteliales prostáticas normales y representa uno de los antígenos asociados a tumor más caracterizados en el cáncer de próstata. Fisiológicamente está presente en el líquido seminal en una alta concentración y actúa dividiendo la proteína de alto peso molecular responsable del coágulo seminal en polipéptidos más pequeños. Esta acción resulta en la licuación del coágulo. El PSA también está presente en el suero y se puede medir de forma fiable bien mediante un ensayo inmunoradiométrico monoclonal, bien mediante un radioinmunoensayo policlonal. El PSA es el marcador tumoral más utilizado para investigar, diagnosticar y controlar el cáncer de próstata en la actualidad. En particular está muy generalizado el uso clínico de varios inmunoensayos para la detección de PSA en suero. Recientemente se ha desarrollado un ensayo de reacción en cadena de la polimerasa con transcriptasa inversa (RT-PCR) para ARNm de PSA en suero. Sin embargo, el PSA no está reconocido como un marcador específico de enfermedad, ya que se pueden detectar niveles elevados de PSA en un gran porcentaje de pacientes con BPH y prostatitis (25-86%) (Gao et al., 1997, *Prostate* 31: 264-281), así como en otras afecciones no malignas y en algunos hombres normales, un factor que limita significativamente la especificidad diagnóstica de este marcador. En el contexto de esta invención, la secuencia preferente del al menos un ARN, preferiblemente del ARNm, que codifica PSA (antígeno prostático específico) utilizado en la composición inmunoestimuladora de acuerdo con la invención contiene o comprende una secuencia tal como está depositada bajo el número de acceso NM_001648, más preferiblemente contiene o comprende una secuencia tal como se muestra en la Figura 1 (SEQ ID NO: 1), de forma incluso más preferible contiene o comprende una secuencia codificadora tal como se muestra en cualquiera de las Figuras 2 o 3 (SEQ ID NO: 2 o 3). De acuerdo con otra realización preferible, el al menos un ARN de la composición inmunoestimuladora activa que codifica PSA puede codificar alternativa o adicionalmente una secuencia antigénica de PSA seleccionada de entre un fragmento, una variante o un epítipo de una secuencia de PSA tal como está depositada bajo el número de acceso NM_001648 o tal como se muestra en cualquiera de las Figuras 1, 2 o 3 (SEQ ID NO: 1, 2 o 3).

Uno de los al menos cuatro ARN de la composición inmunoestimuladora activa codifica PSMA. En el contexto de esta invención, "PSMA" es "antígeno de membrana específico de próstata" y se puede denominar con su sinónimo FLOH1 (folato hidrolasa 1) o "PSM". El PSMA es una glicoproteína transmembrana de tipo II de 100 kDa, estando limitada la expresión de PSMA en gran medida a tejidos de la próstata, aunque se han observado niveles detectables de ARNm de PSMA en el cerebro, las glándulas salivares, el intestino delgado y en carcinoma de células renales (Israeli et al., 1993, *Cancer Res* 53: 227-230). El PSMA es altamente expresado en la mayoría de los cánceres de próstata primarios y metastásicos, pero también en la mayoría de los especímenes de neoplasia interepitelial normal (Gao et al. (1997), supra). En particular, el PSMA es altamente expresado en células de cáncer de próstata y en la neovascularización de tumores sólidos no prostáticos y es una diana para agentes de formación de imágenes y terapéuticos anticáncer. El PSMA actúa como una glutamato-

carboxipeptidasa (GCPII) en sustratos de moléculas pequeñas, incluyendo folato, el fármaco anticáncer metotrexato y el neuropéptido *N*-acetil-L-aspartil-L-glutamato. En el cáncer de próstata se ha demostrado que la expresión de PSMA está en correlación con la progresión de la enfermedad, expresándose los niveles más altos en caso de enfermedad refractaria a la terapia hormonal y enfermedad metastásica. La localización celular del PSMA es citoplásmica y/o membranosa. El PSMA está considerado como un biomarcador del cáncer de próstata (PCa) y está siendo sometido a una intensa investigación para su uso como agente de formación de imágenes y terapéutico. En el contexto de esta invención, la secuencia preferente del al menos un ARN, preferiblemente del ARNm, que codifica PSMA (antígeno de membrana específico de próstata), utilizado en la composición inmunoestimuladora activa de acuerdo con la invención contiene o comprende una secuencia tal como está depositada bajo el número de acceso NM_004476, de forma especialmente preferente contiene o comprende una secuencia tal como se muestra en la Figura 4 (SEQ ID NO: 4), de forma incluso más preferente contiene o comprende una secuencia codificadora tal como se muestra en cualquiera de las Figuras 5 o 6 (SEQ ID NO: 5 o 6). De acuerdo con otra realización preferente, el al menos un ARN de la composición inmunoestimuladora activa que codifica PSMA puede codificar alternativa o adicionalmente una secuencia de antígeno de PSMA seleccionada de entre un fragmento, una variante o un epítipo de una secuencia de PSMA tal como está depositada bajo el número de acceso NM_004476 o tal como se muestra en cualquiera de las Figuras 5 o 6 (SEQ ID NO: 5 o 6).

Uno de los al menos cuatro ARN de la composición inmunoestimuladora activa codifica PSCA. En el contexto de esta invención, "PSCA" es "antígeno de células madre de próstata". El PSCA es ampliamente sobreexpresado en todas las etapas del cáncer de próstata, incluyendo neoplasia intraepitelial prostática (PIN) de alto grado, tumores de próstata dependientes de andrógenos e independientes de andrógenos. El gen de PSCA tiene un 30% de homología con el antígeno-2 de células madre, un miembro de la familia Thy-1/Ly-6 de antígenos de superficie celular anclados a glicosil-fosfatidilinositol (GPI), y codifica una proteína de 123 aminoácidos con una secuencia señal amino-terminal, una secuencia de anclaje GPI carboxi-terminal y múltiples sitios de N-glicosilación. La expresión de ARNm de PSCA está muy aumentada en xenoinjertos de cáncer de próstata tanto dependientes de andrógenos como independientes de andrógenos. El análisis de ARNm *in situ* localiza la expresión de PSCA en el epitelio de células basales, el compartimento de células madre putativas de la próstata. El análisis por citometría de flujo demuestra que el PSCA es expresado predominantemente en la superficie celular y está anclado por un enlace de GPI. El análisis de hibridación fluorescente *in situ* localiza el gen de PSCA en el cromosoma 8q24.2, una región de ganancia alélica en más de un 80% de los cánceres de próstata. El PSCA puede utilizarse como un marcador del cáncer de próstata para discriminar entre cánceres de próstata malignos, glándulas prostáticas normales y neoplasias no malignas. Por ejemplo, el PSCA es expresado en niveles muy altos en cáncer de próstata en relación con la hiperplasia benigna de próstata (BPH). En el contexto de esta invención, la secuencia preferente del al menos un ARN, preferiblemente del ARNm, que codifica PSCA (antígeno de células madre de próstata), utilizado en la composición inmunoestimuladora activa de acuerdo con la invención, contiene o comprende una secuencia tal como está depositada bajo el número de acceso NM_005672, de forma especialmente preferente contiene o comprende una secuencia tal como se muestra en la Figura 7 (SEQ ID NO: 7), de forma incluso más preferente contiene o comprende una secuencia codificadora tal como se muestra en cualquiera de las Figuras 8 o 9 (SEQ ID NO: 8 o 9). De acuerdo con otra realización preferente, el al menos un ARN de la composición inmunoestimuladora activa que codifica PSCA puede codificar alternativa o adicionalmente una secuencia de antígeno de PSCA seleccionada de entre un fragmento, una variante o un epítipo de una secuencia de PSCA tal como está depositada bajo el número de acceso NM_005672 o tal como se muestra en cualquiera de las Figuras 8 o 9 (SEQ ID NO: 8 o 9).

Uno de los al menos cuatro ARN de la composición inmunoestimuladora activa codifica STEAP. En el contexto de esta invención, "STEAP" es "antígeno epitelial de seis dominios transmembrana de la próstata" y se puede denominar con su sinónimo STEAP1. STEAP o STEAP-1 es una nueva proteína de superficie celular y es expresada predominantemente en tejido prostático humano y en otros tumores malignos comunes, incluyendo carcinomas de próstata, vejiga, colon y ovario y en el sarcoma de Ewing, sugiriendo que podría funcionar como un antígeno tumoral prácticamente universal. En particular, el STEAP es altamente expresado en cáncer de

próstata primario, con expresión limitada en tejidos normales. La positividad de STEAP en muestras de médula presentaba una alta correlación con la supervivencia con nueva metástasis en análisis de Kaplan Meier ($p = 0,001$). En el contexto de esta invención, la secuencia preferente del al menos un ARN, preferiblemente del ARNm, que codifica STEAP (antígeno epitelial de seis dominios transmembrana de la próstata) (o STEAP1),
 5 utilizado en la composición inmunoestimuladora activa de acuerdo con la invención, contiene o comprende una secuencia tal como está depositada bajo el número de acceso NM_012449, de forma especialmente preferente contiene o comprende una secuencia tal como se muestra en la Figura 10 (SEQ ID NO: 10), de forma incluso más preferente contiene o comprende una secuencia codificadora tal como se muestra en cualquiera de las Figuras 11 o 12 (SEQ ID NO: 11 o 12). De acuerdo con otra realización preferente, el al menos un ARN de la
 10 composición inmunoestimuladora activa que codifica STEAP puede codificar alternativa o adicionalmente una secuencia de antígeno de STEAP seleccionada de entre un fragmento, una variante o un epítipo de una secuencia de STEAP tal como está depositada bajo el número de acceso NM_012449 o tal como se muestra en cualquiera de las Figuras 11 o 12 (SEQ ID NO: 11 o 12).

Los antígenos, proteínas antigénicas o péptidos antigénicos tal como se definen más arriba que pueden ser
 15 codificados por el al menos un ARN de la composición (inmunoestimuladora) activa de acuerdo con la presente invención. Aquí también se dan a conocer fragmentos o variantes de estas secuencias. Estos fragmentos o variantes pueden comprender normalmente una secuencia que tiene una homología de secuencia con uno de los antígenos, proteínas antigénicas o péptidos antigénicos arriba mencionados, o secuencias, o sus secuencias de ácido nucleico codificadoras, de al menos un 5%, 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, preferiblemente al menos
 20 un 80%, igualmente de forma especialmente preferible al menos un 85%, de forma incluso más preferible al menos un 90% y de forma totalmente preferible al menos un 95% o incluso un 97%, con la secuencia de tipo silvestre completa, bien a nivel de ácido nucleico o a nivel de aminoácido.

En el contexto de la presente invención, los "fragmentos" de antígenos, proteínas antigénicas o péptidos
 25 antigénicos pueden comprender una secuencia de un antígeno, proteína antigénica o péptido antigénico tal como se definen más arriba, que, en relación con su secuencia de aminoácidos (o su secuencia de ácido nucleico codificada), está truncada en posición N-terminal, C-terminal y/o intrasecuencial en comparación con la secuencia de aminoácidos de la proteína (nativa) original (o su secuencia de ácido nucleico codificada). Por tanto, dicho truncamiento puede tener lugar tanto a nivel de los aminoácidos o correspondientemente a nivel del ácido nucleico. Así, una homología de secuencia con respecto a dicho fragmento tal como se define más arriba
 30 se puede referir preferiblemente al antígeno, la proteína antigénica o el péptido antigénico completos tal como se definen más arriba, o a la secuencia de ácido nucleico (codificadora) completa de dicho antígeno, proteína antigénica o péptido antigénico.

En el contexto de la presente invención, los fragmentos de antígenos, proteínas antigénicas o péptidos
 35 antigénicos pueden comprender además una secuencia de antígeno, proteína antigénica o péptido antigénico tal como se definen más arriba de una longitud de aproximadamente 6 a aproximadamente 20 o más aminoácidos, por ejemplo fragmentos tal como los procesados y presentados por moléculas de MHC de clase I, preferiblemente de una longitud de aproximadamente 8 a aproximadamente 10 aminoácidos, por ejemplo 8, 9 o 10 (o incluso 6, 7, 11 o 12 aminoácidos), o fragmentos tal como los procesados y presentados por moléculas de MHC de clase
 40 II, preferiblemente de una longitud de aproximadamente 13 o más aminoácidos, por ejemplo 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20 o incluso más aminoácidos, pudiendo seleccionarse estos fragmentos entre cualquier parte de la secuencia de aminoácidos. Normalmente, estos fragmentos son reconocidos por células T en forma de un complejo que consiste en el fragmento de péptido y una molécula de MHC, es decir, los fragmentos normalmente no son reconocidos en su forma nativa.

Los fragmentos de antígenos, proteínas antigénicas o péptidos antigénicos tal como se definen aquí también
 45 pueden comprender epítopos de estos antígenos, proteínas antigénicas o péptidos antigénicos. En el contexto de la presente invención, los epítopos (también denominados "determinantes antigénicos") son normalmente fragmentos localizados sobre la superficie exterior de antígenos, proteínas antigénicas o péptidos antigénicos

(nativos) tal como se definen aquí, que preferiblemente tienen de 5 a 15 aminoácidos, de forma especialmente preferible tienen de 5 a 12 aminoácidos, de forma incluso más preferible tienen de 6 a 9 aminoácidos, que pueden ser reconocidos por anticuerpos o receptores de células B, es decir, en su forma nativa. Estos epítomos de antígenos, proteínas antigénicas o péptidos antigénicos se pueden seleccionar además entre cualquiera de las variantes aquí mencionadas de dichos antígenos, proteínas antigénicas o péptidos antigénicos. En este contexto, los determinantes antigénicos pueden ser epítomos conformacionales o discontinuos que están compuestos por segmentos de los antígenos, proteínas antigénicas o péptidos antigénicos tal como se definen aquí que son discontinuos en la secuencia de aminoácidos de los antígenos, proteínas antigénicas o péptidos antigénicos tal como se definen aquí, pero que están reunidos en la estructura tridimensional, o epítomos continuos o lineales que están compuestos por una cadena de polipéptidos simple.

Las "variantes" de antígenos, proteínas antigénicas o péptidos antigénicos tal como se definen más arriba pueden ser codificadas por el al menos un ARN de la composición (inmunoestimuladora) activa de acuerdo con la presente invención, siendo intercambiados ácidos nucleicos del al menos un ARN(m) que codifica el antígeno, proteína antigénica o péptido antigénico tal como se definen más arriba. De este modo se puede generar un antígeno, proteína antigénica o péptido antigénico que tiene una secuencia de aminoácidos que se diferencia de la secuencia original en una o más mutaciones, tal como uno o más aminoácidos sustituidos, insertados y/o suprimidos. Preferiblemente, estos fragmentos y/o variantes tienen la misma función biológica o actividad específica en comparación con el antígeno nativo o proteína antigénica de longitud completa, por ejemplo su propiedad antigénica específica.

Los ARN de la composición inmunoestimuladora activa de acuerdo con la presente invención también pueden codificar un antígeno o una proteína antigénica tal como se definen más arriba, comprendiendo la secuencia de aminoácidos codificada una o más sustituciones de aminoácidos conservadoras en comparación con su secuencia fisiológica. Estas secuencias de aminoácidos codificadas, así como sus secuencias de nucleótidos codificadas, en particular entran dentro del término "variantes" tal como se define más arriba. Las sustituciones en las que se intercambian entre sí aminoácidos procedentes de la misma clase se denominan sustituciones conservadoras. En particular se trata de aminoácidos que tienen cadenas laterales alifáticas, cadenas laterales con carga positiva o negativa, grupos aromáticos en las cadenas laterales o aminoácidos cuyas cadenas laterales pueden entrar en puentes de hidrógeno, por ejemplo cadenas laterales que tienen una función hidroxilo. Esto significa que, por ejemplo, un aminoácido que tiene una cadena lateral polar es sustituido por otro aminoácido que tiene una cadena lateral polar similar, o que, por ejemplo, un aminoácido caracterizado por una cadena lateral hidrófoba es sustituido por otro aminoácido que tiene una cadena lateral hidrófoba (por ejemplo serina (treonina) por treonina (serina) o leucina (isoleucina) por isoleucina (leucina)). Son posibles inserciones y sustituciones en particular en aquellas posiciones de la secuencia que no producen ninguna modificación de la estructura tridimensional o que no afectan a la región de unión. Las modificaciones de una estructura tridimensional por inserciones o deleciones se pueden determinar fácilmente, por ejemplo utilizando espectros CD (espectros de dicroísmo circular) (Urry, 1985, Absorption, Circular Dichroism and ORD of Polypeptides, en: Modern Physical Methods in Biochemistry, Neuberger et al. (ed.), Elsevier, Amsterdam).

Además, las variantes de antígenos, proteínas antigénicas o péptidos antigénicos tal como se definen más arriba, que pueden ser codificadas por los ARN de la composición inmunoestimuladora activa de acuerdo con la presente invención, también pueden comprender aquellas secuencias en las que nucleótidos de los ARN(m) están intercambiados de acuerdo con la degeneración del código genético sin conducir a una alteración de la secuencia de aminoácidos respectivos del antígeno, proteína antigénica o péptido antigénico, es decir, la secuencia de aminoácidos o al menos parte de la misma no se puede diferenciar de la secuencia original en una o más mutaciones dentro del significado arriba indicado.

Para determinar el porcentaje en el que dos secuencias (secuencias de ácido nucleico, por ejemplo secuencias de ARN o ARNm tal como se definen aquí, o secuencias de aminoácidos, preferiblemente sus secuencias de aminoácidos codificadas, por ejemplo las secuencias de aminoácidos de los antígenos, proteínas antigénicas o péptidos antigénicos tal como se definen más arriba) son idénticas, las secuencias se pueden alinear para después compararlas entre sí. Por c

sertar intersticios en la secuencia de

la primera secuencia y el componente se puede comparar en la posición correspondiente de la segunda secuencia. Si una posición de la primera secuencia es ocupada por el mismo componente que en una posición de la segunda secuencia, las dos secuencias son idénticas en esta posición. El porcentaje en el que dos secuencias son idénticas es función del número de posiciones idénticas divididas entre el número total de posiciones. El porcentaje en que dos secuencias son idénticas se puede determinar utilizando un algoritmo matemático. Un ejemplo preferente, pero no limitativo, de algoritmo matemático que puede emplearse es el algoritmo de Karlin et al. (1993), PNAS USA, 90:5873-5877 o Altschul et al. (1997), Nucleic Acids Res., 25:3389-3402. En el programa BLAST está integrado un algoritmo de este tipo. Mediante este programa se pueden identificar secuencias que son idénticas a las secuencias de la presente invención en una medida determinada.

- 5 La composición inmunoestimuladora activa de acuerdo con la presente invención comprende, tal como se define más arriba, al menos cuatro ARN, que codifican cada uno antígenos diferentes seleccionados entre los antígenos del grupo arriba indicado, dado que, de acuerdo con la invención, una combinación específica de al menos cuatro antígenos diferentes del grupo anteriormente mencionado puede estimular eficazmente el sistema inmunitario (adaptativo) para posibilitar el tratamiento del cáncer de próstata (PCa). No obstante, la presente invención
- 10 también puede proporcionar composiciones inmunoestimuladoras activas que comprenden al menos un ARN que codifica cuatro antígenos diferentes seleccionados entre cualesquiera de los antígenos del grupo arriba indicado, siendo posible y estando incluida en la presente invención cualquier combinación de estos antígenos.

De forma especialmente preferente, la presente invención también puede proporcionar una composición inmunoestimuladora activa que comprende al menos un ARN que codifica al menos cuatro antígenos diferentes

20 seleccionados entre cualquiera de los antígenos del grupo arriba indicado, siendo posible cualquier combinación de estos antígenos.

Por consiguiente, debido a otra realización particularmente preferente, un ARN de la composición inmunoestimuladora activa de la presente invención puede codificar al menos dos antígenos (preferiblemente diferentes) seleccionados entre cualesquiera de los antígenos del grupo arriba mencionado que comprende (al

25 menos) una cualquiera de las siguientes combinaciones de antígenos:

- PSA y PSMA, o
- PSA y PSCA, o
- PSA y STEAP, o
- PSMA y PSCA, o
- 30 • PSMA y STEAP, o
- PSCA y STEAP,
- o
- PSA, PSMA y PSCA, o
- PSA, PSMA y STEAP, o
- 35 • PSMA, PSCA y STEAP, o
- PSA, PSCA y STEAP,
- o
- PSA, PSMA, PSCA y STEAP.

De acuerdo con otra realización preferente, la presente invención proporciona una composición inmunoestimuladora activa que comprende un ARN que codifica al menos dos, tres o cuatro antígenos (preferiblemente diferentes),

40

a) seleccionándose al menos un antígeno entre:

- STEAP (antígeno epitelial de seis dominios transmembrana de la próstata); y

b) seleccionándose el o los otros antígenos entre al menos un antígeno de cualquiera de los siguientes antígenos específicos o combinaciones de los mismos:

45

- PSA (antígeno prostático específico), o
- PSMA (antígeno de membrana específico de próstata), o
- PSCA (antígeno de células madre de próstata);
- O

- 5
- PSA y PSMA, o
 - PSA y PSCA, o
 - PSMA y PSCA;
 - o
 - PSA, PSMA y PSCA.

- 10 De acuerdo con una realización incluso más preferente, la presente invención proporciona una composición inmunoestimuladora activa que comprende un ARN que codifica cuatro antígenos (preferiblemente diferentes) seleccionados entre PSA, PSMA, PSCA y STEAP.

- Los ARN de la composición inmunoestimuladora activa de acuerdo con la presente invención son normalmente cualquier ARN, preferiblemente, de forma no limitativa, un ARN codificador, un ARN circular o lineal, un ARN monocatenario o bicatenario (que también puede ser considerado como un ARN debido a la asociación no covalente de dos ARN monocatenarios) o un ARN parcialmente bicatenario o parcialmente monocatenario, que son al menos parcialmente autocomplementarios (las dos moléculas de ARN parcialmente bicatenario o parcialmente monocatenario están formadas normalmente por una molécula de ARN monocatenario más larga y otra más corta, o por dos moléculas de ARN monocatenarias que tienen aproximadamente la misma longitud, siendo una molécula de ARN monocatenario complementaria en parte a la otra molécula de ARN monocatenario y formando ambas así un ARN bicatenario en esta región, es decir, un ARN parcialmente bicatenario o parcialmente monocatenario con respecto a la secuencia de ARN completa). De forma especialmente preferente, el al menos un ARN de la composición inmunoestimuladora activa de acuerdo con la presente invención es un ARN monocatenario, de forma incluso más preferible un ARN lineal. De forma totalmente preferente, el al menos un ARN de la composición inmunoestimuladora activa de acuerdo con la presente invención es un ARN mensajero (ARNm). En este contexto, un ARN mensajero (ARNm) es normalmente un ARN que está compuesto por (al menos) varios elementos estructurales, por ejemplo una región 5'-UTR opcional, un sitio de unión ribosómico situado en dirección 5' seguido por una región codificadora, una región 3'-UTR opcional que puede estar seguida por una cola poli-A (y/o una cola poli-C).

- Debido a una realización particularmente preferente, cada uno de los diferentes antígenos de la composición inmunoestimuladora activa de la presente invención puede ser codificado por un ARN (monocistrónico), preferiblemente un ARNm (monocistrónico). En otras palabras, la composición inmunoestimuladora activa de la presente invención puede contener al menos cuatro ARN (monocistrónicos), preferiblemente ARNm, pudiendo codificar cada uno de estos cuatro ARN (monocistrónicos), preferiblemente ARNm, solo un antígeno diferente, seleccionado entre el grupo consistente en STEAP, PSA, PSMA y PSCA.

- De acuerdo con otra realización particularmente preferente, la composición inmunoestimuladora activa de la presente invención puede contener (al menos) un ARN bicistrónico o incluso multicistrónico, preferiblemente un ARNm, es decir (al menos) un ARN que porta dos o incluso más de las secuencias codificadoras de los al menos dos antígenos (preferiblemente diferentes), seleccionados entre el grupo consistente en STEAP, PSA, PSMA y PSCA. Dichas secuencias que codifican los al menos dos antígenos (preferiblemente diferentes) del (al menos un) ARN bicistrónico o incluso multicistrónico se pueden separar mediante al menos una secuencia IRES (sitio interno de entrada al ribosoma), tal como se define más abajo. Por tanto, el concepto "que codifican al menos dos antígenos (preferiblemente diferentes)" puede significar, de forma no limitativa, que el (al menos un) ARN (bicistrónico o incluso multicistrónico), preferiblemente un ARNm, puede codificar por ejemplo al menos dos, tres o cuatro antígenos (preferiblemente diferentes) del grupo de antígenos arriba mencionado o sus fragmentos o variantes dentro de las definiciones dadas más arriba. Más preferiblemente, de forma no limitativa, el (al menos un) ARN (bicistrónico o incluso multicistrónico), preferiblemente ARNm, puede codificar por ejemplo al menos

dos, tres o cuatro antígenos (preferiblemente diferentes) del grupo de antígenos o sus fragmentos o variantes dentro de las definiciones arriba dadas consistente en STEAP, PSA, PSMA y PSCA. En este contexto, una llamada secuencia IRES (sitio interno de entrada al ribosoma) tal como se define más arriba puede actuar como un único sitio de unión de ribosoma, pero también puede servir para proporcionar un ARN bicistrónico o incluso multicistrónico tal como se define más arriba que codifica varias proteínas, que deben ser traducidas por los ribosomas independientemente entre sí. Ejemplos de secuencias IRES que pueden ser utilizadas de acuerdo con la invención son las de picornavirus (por ejemplo FMDV), pestivirus (CFFV), poliovirus (PV), virus de la encefalomiocarditis (ECMV), virus de la fiebre aftosa (FMDV), virus de la hepatitis C (HCV), virus de la peste porcina clásica (CSFV), virus de la leucemia mûrida (MLV), virus de la inmunodeficiencia del simio (SIV) o virus de la parálisis del grillo (CrPV).

De acuerdo con otra realización particularmente preferente, la composición inmunoestimuladora activa de la presente invención puede comprender una mezcla de al menos un ARN monocistrónico, preferiblemente ARNm, tal como se define más arriba, y al menos un ARN bicistrónico o incluso multicistrónico, preferiblemente ARNm, tal como se define más arriba. El al menos un ARN monocistrónico y/o el al menos un ARN bicistrónico o incluso multicistrónico preferiblemente codifican antígenos diferentes o sus fragmentos o variantes dentro de las definiciones dadas más arriba, seleccionándose los antígenos preferiblemente de entre el grupo consistente en STEAP, PSA, PSMA y PSCA. No obstante, el al menos un ARN monocistrónico y el al menos un ARN bicistrónico o incluso multicistrónico preferiblemente también pueden codificar antígenos idénticos (en parte) seleccionados entre el grupo de antígenos arriba mencionado, preferiblemente en una de las combinaciones arriba mencionadas, con la condición de que la composición inmunoestimuladora activa de la presente invención en conjunto proporcione al menos cuatro antígenos diferentes tal como se definen más arriba. Esta realización puede resultar ventajosa, por ejemplo, para una administración escalonada, por ejemplo en función del tiempo, de la composición inmunoestimuladora activa de la presente invención a un paciente que lo requiera. Los componentes de dicha composición inmunoestimuladora activa de la presente invención, en particular los diferentes ARN que codifican los antígenos diferentes, pueden estar contenidos, por ejemplo, en (diferentes partes de) una composición de un *kit* de partes, o se pueden administrar por ejemplo por separado como componentes de diferentes composiciones inmunoestimuladoras activas de acuerdo con la presente invención.

Preferiblemente, los ARNm de la composición inmunoestimuladora activa, que codifican antígenos diferentes seleccionados entre el grupo de antígenos arriba definido, normalmente tienen una longitud de aproximadamente 50 a aproximadamente 20.000, o de 100 a aproximadamente 20.000 nucleótidos, preferiblemente de aproximadamente 250 a aproximadamente 20.000 nucleótidos, de forma especialmente preferible de aproximadamente 500 a aproximadamente 10.000, de forma incluso más preferible de aproximadamente 500 a aproximadamente 5.000.

De acuerdo con una realización, los ARN de la composición inmunoestimuladora activa, que codifican antígenos diferentes seleccionados entre el grupo de antígenos arriba indicado, pueden estar en forma de un ARN modificado, pudiendo introducirse en los ARN de la composición inmunoestimuladora activa cualquier modificación tal como se define aquí. Las modificaciones tal como se definen aquí conducen preferiblemente a al menos un ARN estabilizado de la composición inmunoestimuladora activa de la presente invención.

Por tanto, de acuerdo con una primera realización, los ARN de la composición inmunoestimuladora activa de la presente invención se pueden proporcionar como un "ARN estabilizado", preferiblemente un ARNm estabilizado, es decir, un ARN(m) que es esencialmente resistente a la degradación *in vivo* (por ejemplo por una exonucleasa o endonucleasa). Dicha estabilización se puede realizar, por ejemplo, mediante un esqueleto de fosfato modificado del al menos un ARN(m) de la composición inmunoestimuladora activa de la presente invención. Una modificación de esqueleto en relación con la presente invención es una modificación en la que fosfatos del esqueleto de los nucleótidos contenidos en el ARN están modificados químicamente. Los nucleótidos que pueden ser utilizados preferiblemente en este contexto contienen, por ejemplo, un esqueleto de fosfato modificado con fosforotioato, estando sustituido preferiblemente al menos uno de los oxígenos de fosfato contenidos en el esqueleto de fosfato por un átomo de azufre. Los ARN(m) estabilizados también pueden incluir, por ejemplo: análogos de fosfato no iónicos, tales como fosfonatos de alquilo y arilo, en los que el oxígeno de fosfonato

cargado está sustituido por un grupo alquilo o arilo, o fosfodiésteres y alquilfosfotriésteres, en los que el residuo de oxígeno cargado está presente en forma alquilada. Estas modificaciones de esqueleto incluyen normalmente, de forma no limitativa, modificaciones del grupo consistente en metilfosfonatos, fosforamidatos y fosforotioatos (por ejemplo citidina-5'-O-(1-tiofosfato)).

- 5 Los ARN de la composición inmunoestimuladora activa de la presente invención también pueden contener adicional o alternativamente modificaciones de azúcar. Una modificación de azúcar en relación con la presente invención es una modificación química del azúcar de los nucleótidos del al menos un ARN y normalmente incluye, de forma no limitativa, modificaciones de azúcar seleccionadas entre el grupo consistente en 2'-desoxi-2'-fluor-oligorribonucleótido (2'-fluor-2'-desoxicitidina-5'-trifosfato, 2'-fluor-2'-desoxiuridina-5'-trifosfato), 2'-desoxi-2'-desamina oligorribonucleótido (2'-amino-2'-desoxicitidina-5'-trifosfato, 2'-amino-2'-desoxiuridina-5'-trifosfato), 2'-O-alquil-oligorribonucleótido, 2'-desoxi-2'-C-alquil-oligorribonucleótido (2'-O-metilcitidina-5'-trifosfato, 2'-metiluridina-5'-trifosfato), 2'-C-alquil-oligorribonucleótido, e isómeros de los mismos (2'-aracitidina-5'-trifosfato, 2'-arauridina-5'-trifosfato), o azidotrifosfato (2'-azido-2'-desoxicitidina-5'-trifosfato, 2'-azido-2'-desoxiuridina-5'-trifosfato).
- 10
- 15 Los ARN de la composición inmunoestimuladora activa de la presente invención también pueden contener adicional o alternativamente una modificación de base, que preferiblemente es adecuada para aumentar significativamente la expresión de la proteína codificada por la al menos una secuencia de ARN en comparación con la secuencia de ARN no alterada, es decir, natural (= nativa). En este caso, la expresión "significativa" quiere decir un aumento de la expresión de la proteína en comparación con la expresión de la secuencia de ARN nativa
- 20 de al menos un 20%, preferiblemente de al menos un 30%, 40%, 50% o 60%, de forma especialmente preferible de al menos un 70%, 80%, 90% o incluso 100%, y de forma totalmente preferible de al menos un 150%, 200% o incluso 300% o más. En relación con la presente invención, un nucleótido que tiene una modificación de base de este tipo se selecciona preferiblemente entre el grupo de nucleótidos con modificación de base consistente en 2-amino-6-cloropurinarribósido-5'-trifosfato, 2-aminoadenosina-5'-trifosfato, 2-tiocitidina-5'-trifosfato, 2-tiouridina-5'-trifosfato, 4-tiouridina-5'-trifosfato, 5-aminoalilcitidina-5'-trifosfato, 5-aminoaliluridina-5'-trifosfato, 5-bromocitidina-5'-trifosfato, 5-bromouridina-5'-trifosfato, 5-yodocitidina-5'-trifosfato, 5-yodouridina-5'-trifosfato, 5-metilcitidina-5'-trifosfato, 5-metiluridina-5'-trifosfato, 6-azacitidina-5'-trifosfato, 6-azauridina-5'-trifosfato, 6-cloropurinarribósido-5'-trifosfato, 7-desazaadenosina-5'-trifosfato, 7-desazaguanosina-5'-trifosfato, 8-azaadenosina-5'-trifosfato, 8-azidoadenosina-5'-trifosfato, bencimidazol-ribósido-5'-trifosfato, N1-metiladenosina-5'-trifosfato, N1-metilguanosina-5'-trifosfato, N6-metiladenosina-5'-trifosfato, O6-metilguanosina-5'-trifosfato, pseudouridina-5'-trifosfato, o puomicina-5'-trifosfato, xantosina-5'-trifosfato. Se da una preferencia particular a nucleótidos para modificaciones de base seleccionados entre el grupo de nucleótidos con modificación de base consistente en 5-metilcitidina-5'-trifosfato, 7-desazaguanosina-5'-trifosfato, 5-bromocitidina-5'-trifosfato, y pseudouridina-5'-trifosfato.
- 25
- 30
- 35 De acuerdo con otra realización, los ARN de la composición inmunoestimuladora activa de la presente invención se pueden modificar (y preferiblemente estabilizar) igualmente introduciendo otros nucleótidos modificados que contienen modificaciones de sus fracciones ribosa o de base. En general, los ARN(m) de la composición inmunoestimuladora activa de la presente invención pueden contener cualquier nucleótido nativo (= natural), por ejemplo guanosina, uridina, adenosina y/o citidina, o un análogo de las mismas. En este contexto, los análogos
- 40 de nucleótidos se definen como variantes no nativas de nucleótidos nativos. Por consiguiente, los análogos son nucleótidos derivados químicamente con grupos funcionales no nativos, que preferiblemente se añaden al nucleótido natural o se suprimen del mismo, o que sustituyen a los grupos funcionales naturales de un nucleótido. Así, cada componente del nucleótido natural puede estar modificado, en concreto el componente de base, el componente de azúcar (ribosa) y/o el componente de fosfato que forma el esqueleto (véase más arriba) de la
- 45 secuencia de ARN. Los análogos de guanosina, uridina, adenosina y citidina incluyen, de forma no limitativa, cualquier guanosina, uridina, adenosina, timidina o citidina que haya sido alterada químicamente, por ejemplo por acetilación, metilación, hidroxilación, etc., incluyendo 1-metiladenosina, 1-metilguanosina, 1-metilinosina, 2,2-dimetilguanosina, 2,6-diaminopurina, 2'-amino-2'-desoxiadenosina, 2'-amino-2'-desoxicitidina, 2'-amino-2'-desoxiguanosina, 2'-amino-2'-desoxiuridina, 2-amino-6-cloropurina-ribósido, 2-aminopurina-ribósido, 2'-

araadenosina, 2'-aracitidina, 2'-arauridina, 2'-acido-2'-desoxiadenosina, 2'-acido-2'-desoxicitidina, 2'-acido-2'-desoxiguanosina, 2'-acido-2'-desoxiuridina, 2-cloroadenosina, 2'-fluor-2'-desoxiadenosina, 2'-fluor-2'-desoxicitidina, 2'-fluor-2'-desoxiguanosina, 2'-fluor-2'-desoxiuridina, 2'-fluorotimidina, 2-metiladenosina, 2-metilguanosina, 2-metiltio-N6-isopenenil-adenosina, 2'-O-metil-2-aminoadenosina, 2'-O-metil-2'-desoxiadenosina, 2'-O-metil-2'-desoxicitidina, 2'-O-metil-2'-desoxiguanosina, 2'-O-metil-2'-desoxiuridina, 2'-O-metil-5-metiluridina, 2'-O-metilinosina, 2'-O-metilpseudouridina, 2-tiocitidina, 2-tiocitidina, 3-metilcitidina, 4-acetilcitidina, 4-tiouridina, 5-(carboxihidroximetil)uridina, 5,6-dihidrouridina, 5-aminoalilcitidina, 5-aminoalil-desoxiuridina, 5-bromouridina, 5-carboximetilaminometil-2-tiouridina, 5-carboximetilaminometil-uridina, 5-cloro-ara-citidina, 5-fluorouridina, 5-yodouridina, 5-metoxycarbonilmetil-uridina, 5-metoxiuridina, 5-metil-2-tiouridina, 6-azacidina, 6-azauridina, 6-cloro-7-desaza-guanosina, 6-cloropurina-ribósido, 6-mercapto-guanosina, 6-metil-mercaptapurina-ribósido, 7-desaza-2'-desoxi-guanosina, 7-desazaadenosina, 7-metilguanosina, 8-azaadenosina, 8-bromoadenosina, 8-bromoguanosina, 8-mercaptoguanosina, 8-oxoguanosina, bencimidazol-ribósido, beta-D-manosil-queosina, dihidrouridina, inosina, N1-metiladenosina, N6-([6-aminohehil]carbamoilmetil)adenosina, N6-isopenteniladenosina, N6-metiladenosina, N7-metilxantosina, N-uracil-5-oxiacetato de metilo, puomicina, queosina, ácido uracil-5-oxiacético, uracil-5-oxiacetato de metilo, wibutoxosina, xantosina y xiloadenosina. La preparación de estos análogos es conocida por los expertos en la técnica, por ejemplo de las Patentes US 4.373.071, US 4.401.796, US 4.415.732, US 4.458.066, US 4.500.707, US 4.668.777, US 4.973.679, US 5.047.524, US 5.132.418, US 5.153.319, US 5.262.530 y 5.700.642. En el caso de un análogo tal como se describe más arriba, de acuerdo con la invención se puede dar una preferencia particular a aquellos análogos que aumentan la inmunogenicidad del ARN de la composición inmunoestimuladora activa de la invención y/o que no interfieren en otra modificación del ARN que haya sido introducida.

De acuerdo con una realización particular, los ARN de la composición inmunoestimuladora activa de la presente invención pueden contener una modificación de lípido. Dicho ARN con modificación de lípido comprende normalmente un ARN tal como se define aquí que codifica al menos dos antígenos seleccionados entre el grupo de antígenos tal como se define más arriba, preferiblemente en las combinaciones arriba indicadas. Normalmente, dicho ARN con modificación de lípido comprende además al menos un enlazador unido de forma covalente con este ARN, y al menos un lípido unido de forma covalente con el enlazador respectivo. Alternativamente, el ARN con modificación de lípido comprende (al menos) un ARN tal como se define aquí y al menos un lípido (bifuncional) enlazado de forma covalente (sin enlazador) con este ARN. De acuerdo con una tercera alternativa, el ARN con modificación de lípido comprende un ARN tal como se define aquí, al menos un enlazador unido de forma covalente con este ARN, y al menos un lípido unido de forma covalente con el enlazador respectivo, y también al menos un lípido (bifuncional) unido de forma covalente (sin enlazador) con este ARN.

El lípido contenido en el al menos un ARN de la composición inmunoestimuladora activa de la invención (complejado o unido de forma covalente a la misma) es normalmente un lípido o un residuo lipófilo que preferiblemente es por sí mismo biológicamente activo. Estos lípidos incluyen preferiblemente sustancias naturales o compuestos tales como vitaminas, por ejemplo alfa-tocoferol (vitamina E), incluyendo RRR-alfa-tocoferol (anteriormente D-alfa-tocoferol), L-alfa-tocoferol, racemato D,L-alfa-tocoferol, vitamina E succinato (VES), o vitamina A y sus derivados, por ejemplo ácido retinoico, retinol, vitamina D y sus derivados, por ejemplo vitamina D y también precursores de ergosterol de la misma, vitamina E y sus derivados, vitamina K y sus derivados, por ejemplo vitamina K y compuestos de quinona o fitol relacionados, o esteroides, tales como ácidos biliares, por ejemplo ácido cólico, ácido desoxicólico, ácido deshídricólico, cortisona, digoxigenina, testosterona, colesterol o tiocolesterol. Otros lípidos o residuos lipófilos dentro del alcance de la presente invención incluyen, de forma no limitativa, polialquilenglicoles (Oberhauser et al., Nucl. Acids Res., 1992, 20, 533), grupos alifáticos, por ejemplo alcanos(C₁-C₂₀), alquenos(C₁-C₂₀) o alcanoles(C₁-C₂₀), etc., por ejemplo residuos dodecanodiol, hexadecanol o undecilo (Saison-Behmoaras et al., EMBO J, 1991, 10, 111; Kabanov et al., FEBS Lett., 1990, 259, 327; Svinarchuk et al., Biochimie, 1993, 75, 49), fosfolípidos, por ejemplo fosfatidilglicerol, diacilfosfatidilglicerol, fosfatidilcolina, dipalmitoilfosfatidilcolina, diestearoilfosfatidilcolina, fosfatidilserina, fosfatidiletanolamina, dihexadecil-rac-glicerol, esfingolípidos, cerebrósidos, gangliósidos, o trietilamonio 1,2-di-O-hexadecil-rac-glicero-3-H-fosfonato (Manoharan et al., Tetrahedron Lett., 1995, 36, 3651; Shea et al., Nucl. Acids

Res., 1990, 18, 3777), poliaminas o polialquilenglicoles, por ejemplo polietilenglicol (PEG) (Manoharan et al., Nucleosides & Nucleotides, 1995, 14, 969), hexaetilenglicol (HEG), palmitina o residuos de palmitilo (Mishra et al., Biochim. Biophys. Acta, 1995, 1264, 229), octadecilaminas o residuos de hexilamino-carbonil-oxicolesterol (Crooke et al., J. Pharmacol. Exp. Ther., 1996, 277, 923), y también ceras, terpenos, hidrocarburos alicíclicos, residuos de ácidos grasos saturados y monoinsaturados o poliinsaturados, etc.

Igualmente, los ARN de la composición inmunoestimuladora activa de la presente invención se pueden estabilizar para prevenir la degradación del ARN *in vivo* mediante diversas estrategias. En la técnica se sabe que la inestabilidad y la degradación (rápida) del ARNm o del ARN *in vivo* puede representar en general un grave problema en la administración de las composiciones basadas en ARN. Esta inestabilidad del ARN se debe normalmente a enzimas degradadoras de ARN. Por consiguiente, la degradación de ARNm en el citoplasma de células está regulada muy finamente y las contaminaciones por RNasa generalmente se pueden eliminar mediante un tratamiento especial antes de utilizar dichas composiciones, en particular con pirocarbonato de dietilo (DEPC). En este contexto, en la técnica anterior se conocen varios mecanismos de degradación natural que también pueden ser utilizados. Por ejemplo, la estructura terminal tiene normalmente una importancia crítica para un ARNm *in vivo*. Por ejemplo, en el extremo 5' de los ARNm naturales usualmente hay una llamada "estructura de casquete" (un nucleótido de guanosina modificado) y en el extremo 3' hay normalmente una secuencia de hasta 200 nucleótidos de adenosina (la llamada cola poli-A).

Por tanto, los ARN de la composición inmunoestimuladora activa de la presente invención, en particular si se proporcionan como ARNm, se pueden estabilizar contra la degradación por RNasas mediante la adición de una llamada estructura "de caperuza 5' ". En este contexto se da una preferencia particular a un m⁷G(5')ppp(5'(A,G(5')ppp(5')A o G(5')ppp(5')G como estructura "de caperuza 5' ". Sin embargo, esta modificación solo se introduce si todavía no se ha introducido ninguna modificación, por ejemplo una modificación de lípido, en el extremo 5' del ARN(m) de la composición inmunoestimuladora de la invención, o si la modificación no interfiere en las propiedades inmunógenas del ARN(m) (no modificado o modificado químicamente).

De acuerdo con otra realización preferente, los ARN de la composición inmunoestimuladora activa de la presente invención puede contener, en especial si el ARN está en forma de un ARNm, una cola poli-A en el extremo 3', normalmente de aproximadamente 10 a 200 nucleótidos de adenosina, preferiblemente de aproximadamente 10 a 100 nucleótidos de adenosina, de forma especialmente preferible de aproximadamente 20 a 100 nucleótidos de adenosina o de forma incluso más preferible de aproximadamente 40 a 80 nucleótidos de adenosina.

De acuerdo con otra realización preferente, los ARN de la composición inmunoestimuladora activa de la presente invención pueden contener, en especial si el ARN está en forma de un ARNm, una cola poli-C en el extremo 3', normalmente de aproximadamente 10 a 200 nucleótidos de citidina, preferiblemente de aproximadamente 10 a 100 nucleótidos de citidina, de forma especialmente preferible de aproximadamente 20 a 70 nucleótidos de citidina o de forma todavía más preferible de aproximadamente 20 a 60 o incluso de 10 a 40 nucleótidos de citidina.

De acuerdo con otra realización, los ARN de la composición inmunoestimuladora activa de la presente invención se pueden modificar y así estabilizar, en especial si el ARN está en forma de un ARNm, modificando el contenido de G/C del ARN, preferiblemente de la región codificadora de los ARN.

En una realización particularmente preferente de la presente invención, el contenido de G/C de la región codificadora de los ARN(m) de la composición inmunoestimuladora activa de la presente invención está modificado, en particular aumentado, en comparación con el contenido de G/C de la región codificadora de su ARN(m) de tipo silvestre particular, es decir, el ARN(m) no modificado. Preferiblemente, la secuencia de aminoácidos codificada de los ARN(m) no está modificada en comparación con la secuencia de aminoácidos codificada del ARN(m) de tipo silvestre particular.

Esta modificación de los ARN(m) de la composición inmunoestimuladora activa de la presente invención se basa en el hecho de que la secuencia de cualquier región de ARN(m) a ser traducida es importante para una traducción eficiente de dicho ARN(m). Por tanto, la composición y la secuencia de diversos nucleótidos son importantes. En

particular, las secuencias que tienen un contenido aumentado de G (guanosina)/C (citocina) son más estables que las secuencias que tienen un contenido aumentado de A (adenosina)/U (uracilo). De acuerdo con la invención, los codones del ARN(m) se modifican en comparación con su ARN(m) de tipo silvestre, mientras conservan la secuencia de aminoácidos traducida, de modo que incluyen una cantidad aumentada de nucleótidos G/C. En lo que respecta al hecho de que varios codones codifican un mismo aminoácido (la llamada degeneración del código genético), se pueden determinar los codones más favorables para la estabilidad (la llamada utilización de codones alternativa).

Dependiendo del aminoácido a ser codificado por el al menos un ARN(m), existen diversas posibilidades para la modificación de la secuencia del ARN(m) en comparación con su secuencia de tipo silvestre. En el caso de los aminoácidos codificados por codones que contienen exclusivamente nucleótidos G o C no se requiere ninguna modificación del codón. Por tanto, los codones para Pro (CCC o CCG), Arg (CGC o CGG), Ala (GCC o GCG) y Gly (GGC o GGG) no requieren ninguna modificación, ya que no tienen A ni U.

En cambio, los codones que contienen nucleótidos A y/o U se pueden modificar mediante sustitución de otros codones que codifican los mismos aminoácidos pero que no contienen A y/o U. Como ejemplos se mencionan:

los codones para Pro se pueden modificar de CCU o CCA a CCC o CCG;
los codones para Arg se pueden modificar de CGU o CGA o AGA o AGG a CGC o CGG;
los codones para Ala se pueden modificar de GCU o GCA a GCC o GCG;
los codones para Gly se pueden modificar de GGU o GGA a GGC o GGG.

En otros casos, aunque no sea posible eliminar los nucleótidos A o U de los codones, sí es posible disminuir el contenido de A y U utilizando codones que contienen menos nucleótidos A y/o U. Como ejemplos se mencionan:

los codones para Phe se pueden modificar de UUU a UUC;
los codones para Leu se pueden modificar de UUA, UUG, CUU o CUA a CUC o CUG;
los codones para Ser se pueden modificar de UCU o UCA o AGU a UCC, UCG o AGC;
el codón para Tyr se puede modificar de UAU a UAC;
el codón para Cys se puede modificar de UGU a UGC;
el codón para His se puede modificar de CAU a CAC;
el codón para Gln se puede modificar de CAA a CAG;
los codones para Ile se pueden modificar de AUU o AUA a AUC;
los codones para Thr se pueden modificar de ACU o ACA a ACC o ACG;
el codón para Asn se puede modificar de AAU a AAC;
el codón para Lys se puede modificar de AAA a AAG;
los codones para Val se pueden modificar de GUU o GUA a GUC o GUG;
el codón para Asp se puede modificar de GAU a GAC;
el codón para Glu se puede modificar de GAA a GAG;
el codón de terminación UAA se puede modificar a UAG o UGA.

Por otro lado, en el caso de los codones para Met (AUG) y Trp (UGG) no existe ninguna posibilidad de modificación de secuencia.

Las sustituciones arriba citadas se pueden utilizar individualmente o también en todas las combinaciones posibles para aumentar el contenido de G/C de los ARN(m) de la composición (inmunoestimuladora) activa de la presente invención en comparación con su ARN(m) de tipo silvestre particular (es decir, la secuencia original). Por ejemplo, todos los codones para Thr presentes en la secuencia de tipo silvestre se pueden modificar a ACC (o ACG). Sin embargo, preferiblemente se utilizan combinaciones de las posibilidades de sustitución arriba indicadas, por ejemplo:

sustitución de todos los codones codificadores de Thr en la secuencia original (ARN(m) de tipo silvestre) a ACC (o ACG) y
sustitución de todos los codones originalmente codificadores de Ser a UCC (o UCG o AGC);

sustitución de todos los codones codificadores de Ile en la secuencia original a AUC y
 sustitución de todos los codones originalmente codificadores de Lys a AAG y
 sustitución de todos los codones originalmente codificadores de Tyr a UAC;
 sustitución de todos los codones codificadores de Val en la secuencia original a GUC (o GUG) y
 5 sustitución de todos los codones originalmente codificadores de Glu a GAG y
 sustitución de todos los codones originalmente codificadores de Ala a GCC (o GCG) y
 sustitución de todos los codones originalmente codificadores de Arg a CGC (o CGG);
 sustitución de todos los codones codificadores de Val en la secuencia original a GUC (o GUG) y
 sustitución de todos los codones originalmente codificadores de Glu a GAG y
 10 sustitución de todos los codones originalmente codificadores de Ala a GCC (o GCG) y
 sustitución de todos los codones originalmente codificadores de Gly a GGC (o GGG) y
 sustitución de todos los codones originalmente codificadores de Asn a AAC;
 sustitución de todos los codones codificadores de Val en la secuencia original a GUC (o GUG) y
 sustitución de todos los codones originalmente codificadores de Phe a UUC y
 15 sustitución de todos los codones originalmente codificadores de Cys a UGC y
 sustitución de todos los codones originalmente codificadores de Leu a CUG (o CUC) y
 sustitución de todos los codones originalmente codificadores de Gln a CAG y
 sustitución de todos los codones originalmente codificadores de Pro a CCC (o CCG); etc.

Preferiblemente, el contenido de G/C de la región codificadora de los ARN(m) de la composición
 20 inmuoestimuladora activa de la presente invención aumenta al menos en un 7%, de forma especialmente
 preferible al menos en un 15%, de forma particularmente preferible al menos en un 20%, en comparación con el
 contenido de G/C de la región codificada del ARN(m) de tipo silvestre que codifica un antígeno, proteína
 antigénica o péptido antigénico tal como se definen aquí o un fragmento o variante de los mismos. De acuerdo
 con una realización específica se sustituye al menos un 5%, 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, de forma
 25 especialmente preferible al menos un 70%, de forma incluso más preferible al menos un 80% y de forma
 totalmente preferible al menos un 90%, 95% o incluso 100% de los codones sustituibles en la región codificadora
 de un antígeno, proteína antigénica o péptido antigénico tal como se definen aquí, o un fragmento o variante de
 los mismos, o la secuencia completa de la secuencia de ARN(m) de tipo silvestre, aumentando así el contenido
 de GC de dicha secuencia.

30 En este contexto, es particularmente preferible aumentar el contenido de G/C de los ARN(m) de la composición
 inmuoestimuladora activa de la presente invención al máximo (es decir, el 100% de los codones sustituibles),
 en particular en la región codificadora de una proteína, en comparación con la secuencia de tipo silvestre.

De acuerdo con la invención, otra modificación preferente de los ARN(m) de la composición inmuoestimuladora
 activa de la presente invención se basa en el descubrimiento de que la eficiencia de traducción está también
 35 determinada por una frecuencia diferente en la presencia de ARNt en células. Por tanto, si los ARN(m) de la
 composición inmuoestimuladora activa de la presente invención presentan una cantidad incrementada de los
 llamados "codones raros", la secuencia de ARN(m) modificada correspondiente es traducida en un grado
 considerablemente peor que en el caso en el que están presentes codones que codifican ARNt relativamente
 "frecuentes".

40 De acuerdo con la invención, en los ARN(m) modificados de la composición inmuoestimuladora activa de la
 presente invención, la región que codifica la proteína adyuvante está modificada en comparación con la región
 correspondiente del ARN(m) de tipo silvestre de modo que al menos un codón de la secuencia de tipo silvestre
 que codifica un ARNt que es relativamente raro en la célula es cambiado por un codón que codifica un ARNt que
 es relativamente frecuente en la célula y que porta el mismo aminoácido que el ARNt relativamente raro. Mediante
 45 esta modificación, las secuencias de los ARN(m) de la composición inmuoestimuladora activa de la presente
 invención son modificadas de modo que se insertan codones para los que hay disponibles ARNt frecuentemente
 presentes. En otras palabras, de acuerdo con la invención, mediante esta modificación todos los codones de la
 secuencia de tipo silvestre que codifican un ARNt que es relativamente raro en la célula pueden ser cambiados

en cada caso por un codón que codifica un ARNt que es relativamente frecuente en la célula y que, en cada caso, porta el mismo aminoácido que el ARNt relativamente raro.

Los expertos en la técnica saben qué ARNt están presentes de forma relativamente frecuente en la célula y cuáles, en cambio, están presentes de forma relativamente rara; véase, por ejemplo, Akashi, Curr. Opin. Genet. Dev. 2001, 11 (6): 660-666. Los codones que utilizan para el aminoácido particular el ARNt que está presente más frecuentemente, por ejemplo el codón Gly, que utiliza el ARNt que está presente más frecuentemente en la célula (humana), son particularmente preferentes.

De acuerdo con la invención es particularmente preferible unir el contenido de G/C secuencial que está aumentado, en particular maximizado, en los ARN(m) modificados de la composición inmunoestimuladora activa de la presente invención, con los codones "frecuentes" sin modificar la secuencia de aminoácidos de la proteína codificada por la región codificadora del ARN(m). Esta realización preferente posibilita la provisión de ARN(m) traducidos y estabilizados (modificados) de forma particularmente eficiente de la composición inmunoestimuladora activa de la presente invención.

La determinación de un ARN(m) modificado de la composición inmunoestimuladora activa de la presente invención tal como se describe más arriba (contenido de G/C aumentado; intercambio de ARNt) puede realizarse utilizando el programa de ordenador explicado en el documento WO 02/098443. Utilizando este programa de ordenador, la secuencia de nucleótidos de cualquier ARN(m) deseado puede modificarse con ayuda del código genético o la naturaleza degenerativa del mismo de modo que resulte en un contenido máximo de G/C, en combinación con el uso de codones que codifican ARNt que están presentes lo más frecuentemente posible en la célula, preferiblemente no siendo modificada la secuencia de aminoácidos codificada por el ARN(m) modificado, en comparación con la secuencia no modificada. Alternativamente, también es posible modificar únicamente el contenido de G/C o únicamente la utilización de codones en comparación con la secuencia original. En el documento WO 02/098443 también se describe el código fuente en Visual Basic 6.0 (entorno de desarrollo utilizado: Microsoft Visual Studio Enterprise 6.0 con Servicepack 3).

En otra realización preferente de la presente invención, el contenido de A/U en el entorno del sitio de unión del ribosoma de los ARN(m) de la composición inmunoestimuladora activa de la presente invención se aumenta en comparación con el contenido de A/U en el entorno del sitio de unión del ribosoma de su ARN(m) de tipo silvestre particular. Esta modificación (un contenido de A/U aumentado alrededor del sitio de unión del ribosoma) aumenta la eficiencia de la unión de ribosoma con el al menos un ARN(m). Una unión eficaz de los ribosomas con el sitio de unión del ribosoma (secuencia Kozak: GCCGCCACCAUGG (SEQ ID NO: 27), la AUG forma el codón de iniciación) tiene a su vez el efecto de una traducción eficiente del al menos un ARN(m).

De acuerdo con otra realización de la presente invención, los ARN(m) de la composición inmunoestimuladora activa de la presente invención se pueden modificar con respecto a los elementos de secuencia potencialmente desestabilizadores. En particular, la región codificadora y/o la región 5' y/o 3' no traducida del ARN(m) se puede modificar en comparación con el ARN(m) de tipo silvestre particular de modo que no contenga ningún elemento de secuencia desestabilizador, preferiblemente no siendo modificada la secuencia de aminoácidos codificada por el ARN(m) modificado, en comparación con su ARN(m) de tipo silvestre particular. Ya es sabido que, por ejemplo, algunas secuencias de ARN eucariontes presentan elementos de secuencia desestabilizadores (DSE) a los que se unen proteínas señal, que regulan la degradación enzimática del ARN *in vivo*. Por tanto, para una mayor estabilización del ARN(m) modificado, opcionalmente en la región que codifica un antígeno, proteína antigénica o péptido antigénico tal como se definen aquí se pueden llevar a cabo una o más de dichas modificaciones en comparación con la región correspondiente del ARN(m) de tipo silvestre, de forma que dicha región no contenga ningún o esencialmente ningún elemento de secuencia desestabilizador. De acuerdo con la invención, los DSE presentes en las regiones no traducidas (3' y/o 5' UTR) también se pueden eliminar de los ARN(m) de la composición inmunoestimuladora activa de la presente invención mediante dichas modificaciones.

Tales secuencias desestabilizadoras son, por ejemplo, secuencias ricas en AU (AURES), que están presentes en secciones 3' UTR de numerosos ARN inestables (Caput et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 1986, 83: 1670 a 1674). Por consiguiente, los ARN(m) de la composición inmunoestimuladora activa de la presente invención

preferentemente están modificados en comparación con el ARN(m) de tipo silvestre de modo que el ARN(m) no contiene ninguna de dichas secuencias desestabilizadoras. Esto también es aplicable a los motivos de secuencia reconocidos por posibles endonucleasas, por ejemplo la secuencia GAACAAG, que está contenida en el segmento 3' UTR del gen que codifica el receptor de transferrina (Binder et al., EMBO J. 1994, 13: 1969 a 1980).

- 5 Preferiblemente, estos motivos de secuencia también se eliminan en los ARN(m) de la composición inmunoestimuladora activa de la presente invención.

También preferiblemente de acuerdo con la invención, los ARN(m) de la composición inmunoestimuladora activa de la presente invención tienen, en una forma modificada, al menos un IRES tal como se define más arriba y/o al menos una secuencia estabilizadora en 5' y/o 3', en una forma modificada, por ejemplo para aumentar la unión
10 de ribosoma o para posibilitar la expresión de diferentes antígenos codificados localizados en ARN (bicistrónico o incluso multicistrónico) de la composición inmunoestimuladora activa de la presente invención.

Además, de acuerdo con la invención, los ARN(m) de la composición inmunoestimuladora activa de la presente invención tienen preferiblemente al menos una secuencia estabilizadora en 5' y/o 3'. Estas secuencias estabilizadoras en las regiones 5' y/o 3' no traducidas tienen el efecto de aumentar la vida media del al menos
15 un ARN(m) en el citosol. Estas secuencias estabilizadoras pueden tener un 100% de homología de secuencia con respecto a secuencias naturales presentes en virus, bacterias y eucariontes, pero también pueden ser parcial o completamente sintéticas. Como ejemplos de secuencias estabilizadoras que pueden utilizarse en la presente invención para un ARN estabilizado se pueden mencionar las secuencias no traducidas (UTR) del gen de globina, por ejemplo de *Homo sapiens* o *Xenopus laevis*. Otro ejemplo de secuencia estabilizadora tiene la fórmula
20 general (C/U)CCAN_xCCC(U/A)Py_xUC(C/U)CC (SEQ ID NO: 28), que está contenida en el 3' UTR del ARN muy estable que codifica globina, (I)-colágeno, 15-lipoxigenasa o tirosina-hidroxilasa (véase Holcik et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 1997, 94: 2410 a 2414). Evidentemente, estas secuencias estabilizadoras pueden emplearse individualmente o en combinación entre sí, y también en combinación con otras secuencias estabilizadoras conocidas por los expertos en la técnica. Por tanto, los ARN(m) de la composición inmunoestimuladora activa de
25 la presente invención están presentes preferiblemente como ARN estabilizado con UTR (regiones no traducidas) de globina, en particular como ARN estabilizado con UTR de globina.

No obstante, en los ARN de la composición inmunoestimuladora activa de la presente invención se llevan a cabo sustituciones, adiciones o eliminaciones utilizando una matriz de ADN para la preparación de los ARN de la composición inmunoestimuladora activa de la presente invención mediante técnicas de la conocida mutagénesis
30 dirigida o con una estrategia de ligación de oligonucleótidos (véase, por ejemplo, Maniatis et al., Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press, 3ª ed., Cold Spring Harbor, NY, 2001). En un proceso de este tipo, para la preparación del ARN(m) se puede transcribir *in vitro* una molécula de ADN correspondiente. Esta matriz de ADN preferiblemente comprende un promotor adecuado, por ejemplo un promotor T7 o SP6, para la transcripción *in vitro*, seguido por la secuencia de nucleótidos deseada para el ARN
35 que a preparar y una señal de terminación para la transcripción *in vitro*. La molécula de ADN, que forma la matriz de un ARN de interés, se puede preparar mediante proliferación fermentativa y aislamiento subsiguiente como parte de un plásmido que puede ser replicado en bacterias. Plásmidos que se pueden mencionar como adecuados para la presente invención son, por ejemplo, los plásmidos pT7Ts (número de acceso GenBank U26404; Lai et al., Development 1995, 121: 2349 a 2360), la serie pGEM®, por ejemplo pGEM®-1 (número de
40 acceso GenBank X65300; de Promega) y pSP64 (número de acceso GenBank X65327); véase también Mezei y Storts, Purification of PCR Products, en: Griffin and Griffin (ed.), PCR Technology: Current Innovation, CRC Press, Boca Raton, FL, 2001.

La estabilización de los ARN de la composición inmunoestimuladora activa de la presente invención se puede llevar a cabo igualmente asociando o formando un complejo del al menos un ARN, o uniendo éste, con un
45 compuesto catiónico, en particular un compuesto policatiónico, por ejemplo un péptido o una proteína (poli)catiónicos. En particular, el uso de protamina, nucleolina, espermina o espermidina como proteína policatiónica de unión de ácido nucleico para el ARN es particularmente eficaz. Además, también es posible utilizar otros péptidos o proteínas catiónicos, tales como poli-L-lisina o histonas. Este procedimiento para estabilizar ARN se describe en el documento EP-A-1083232. Otras sustancias catiónicas preferentes que pueden

emplearse para estabilizar el ARN de la composición inmunoestimuladora activa de la presente invención incluyen polisacáridos catiónicos, por ejemplo quitosano, polibreno, polietilenoimina (PEI) o poli-L-lisina, etc. La asociación o la formación de complejos del al menos un ARN de la composición inmunoestimuladora activa de la presente invención con compuestos catiónicos, por ejemplo proteínas catiónicas o lípidos catiónicos (por ejemplo, oligofectamina como reactivo de formación de complejos basado en lípidos) preferiblemente aumenta la transferencia del al menos un ARN presente como componente farmacéuticamente activo en las células a ser tratadas o en el organismo que a ser tratado. También se hace referencia a la descripción dada en esta memoria con respecto al efecto estabilizador para los ARN de la composición inmunoestimuladora activa de la presente invención por formación de complejos, que también sostiene la estabilización del ARN.

- 5
 - 10
 - 15
 - 20
 - 25
 - 30
 - 35
 - 40
 - 45
- De acuerdo con otra realización particularmente preferente, los ARN de la composición inmunoestimuladora activa pueden codificar adicional o alternativamente un péptido señal secretor. Estos péptidos señal son secuencias que normalmente tienen una longitud de aproximadamente 15 a 30 aminoácidos y que, de forma no limitativa, preferiblemente están situados en el extremo N del péptido codificado. Los péptidos señal tal como se definen aquí preferiblemente posibilitan el transporte del antígeno, proteína antigénica o péptido antigénico codificado por los ARN de la composición inmunoestimuladora activa a un compartimento celular definido, preferiblemente la superficie celular, el retículo endoplasmático (ER) o el compartimento endosómico-lisosómico. Ejemplos de secuencias de péptidos señal secretores tal como se definen aquí incluyen, de forma no limitativa, secuencias señal de moléculas de MHC clásicas o no clásicas (por ejemplo secuencias señal de moléculas de MHC I y II, por ejemplo de la molécula de MHC de clase I HLA-A*0201), secuencias señal de citoquinas o inmunoglobulinas tal como se definen aquí, secuencias señal de la cadena invariable de inmunoglobulinas o anticuerpos tal como se definen aquí, secuencias señal de Lamp1, tapasina, Erp57, calreticulina, calnexina, y otras proteínas asociadas a membrana, o de proteínas asociadas al retículo endoplasmático (ER) o al compartimento endosómico-lisosómico. De forma particularmente preferible, de acuerdo con la presente invención se pueden utilizar secuencias señal de la molécula de MHC de clase I HLA-A*0201.
- Cualquiera de las modificaciones arriba indicadas puede ser aplicada a los ARN de la composición inmunoestimuladora activa de la presente invención y también a cualquier ARN(m) utilizado en el contexto de la presente invención y, en caso adecuado o necesario, pueden combinarse entre sí en cualquier combinación, con la condición de que estas combinaciones o modificaciones no interfieran entre sí en el ARN respectivo. Los expertos en la técnica podrán hacer esta elección en consecuencia.
- De acuerdo con otra realización, la composición inmunoestimuladora activa de acuerdo con la invención puede comprender un adyuvante. En este contexto, un adyuvante se puede entender como cualquier compuesto que sea adecuado para apoyar la administración y el suministro de la composición inmunoestimuladora activa de acuerdo con la invención. Además, dicho adyuvante puede, de forma no vinculante, iniciar o aumentar una respuesta inmunitaria del sistema inmunitario innato, es decir, una respuesta inmunitaria no específica. En otras palabras, cuando es administrada, la composición inmunoestimuladora activa de acuerdo con la invención normalmente inicia una respuesta inmunitaria adaptativa debido a los al menos dos antígenos codificados por los ARN contenidos en la composición inmunoestimuladora activa de la invención. Adicionalmente, la composición inmunoestimuladora activa de acuerdo con la invención puede generar una respuesta inmunitaria innata (de soporte) debido a la adición de un adyuvante tal como se define aquí a la composición inmunoestimuladora activa de acuerdo con la invención. Dicho adyuvante se puede seleccionar de entre adyuvantes conocidos por los expertos y adecuados para el presente caso, es decir, que apoyan la inducción de una respuesta inmunitaria en un mamífero. Preferiblemente, el adyuvante se puede seleccionar entre el grupo consistente, de forma no limitativa, en TDM, MDP, dipéptido de muramilo, pluronics, solución de alumbre, hidróxido de aluminio, ADJUMER™ (polifosfaceno); gel de fosfato de aluminio; glucanos de algas; algamulina; gel de hidróxido de aluminio (alumbre); gel de hidróxido de aluminio altamente adsorbente de proteínas; gel de hidróxido de aluminio de baja viscosidad; AF o SPT (emulsión de escualano (5%), Tween 80 (0,2%), Pluronic L121 (1,25%), solución salina tampón de fosfato, pH 7,4); AVRIDINE™ (propanodiamina); BAY R1005™ (hidroacetato de (N-(2-desoxi-2-L-leucilamino-b-D-glucopiranosil)-N-octadecil-dodecanoil-amida); CAL-CITRIOL™ (1-alfa,25-dihidroxi-vitamina D3); gel de fosfato de calcio; CAPTM (nanopartículas de fosfato de

calcio); holotoxina colérica, proteína de fusión toxina colérica-A1-proteína-A-D-fragmento, subunidad B de la toxina colérica; CRL 1005 (copolímero de bloques P1205); liposomas que contienen citoquinas; DDA (bromuro de dimetildioctadecilamonio); DHEA (deshidroepiandrosterona); DMPC (dimiristoilfosfatidilcolina); DMPG (dimiristoilfosfatidilglicerol); complejo DOC/alumbre (sal sódica de ácido desoxicólico); adyuvante completo de Freund; adyuvante incompleto de Freund; gamma inulina; adyuvante Gerbu (mezcla de: i) N-acetilglucosaminil-(P1-4)-N-acetilmuramil-L-alanil-D-glutamina (GMDP), ii) cloruro de dimetildioctadecilamonio (DDA), iii) complejo de sal de zinc-L-prolina (ZnPro-8); GM-CSF; GMDP (N-acetilglucosaminil-(b1-4)-N-acetilmuramil-L-alanil-D-isoglutamina); imiquimod (1-(2-metipropil)-1H-imidazo[4,5-c]quinolina-4-amina); ImmTher™ (dipalmitato de N-acetilglucosaminil-N-acetilmuramil-L-Ala-D-isoGlu-L-Ala-glicerol); DRV's (immunoliposomas preparados a partir de vesículas de deshidratación); interferón gamma; interleuquina-1 beta; interleuquina-2; interleuquina-7; interleuquina-12; ISCOMS™; ISCOPREP 7.0.3.™; liposomas; LOXORIBINE™ (7-alil-8-oxoguanosina); adyuvante oral LT (enterotoxina-prototoxina lábil de *E. coli*); microesferas y micropartículas de cualquier composición; MF59™; (emulsión de escualeno en agua); MONTANIDE ISA 51™ (adyuvante incompleto de Freund purificado); MONTANIDE ISA 720™ (adyuvante de aceite metabolizable); MPL™ (3-Q-desacil-4'-monofosforil lípido A); liposomas MTP-PE y MTP-PE ((N-acetil-L-alanil-D-isoglutaminil-L-alanina-2-(1,2-dipalmitoil-sn-glicero-3-(hidroxifosforiloxi))-etilamida, sal monosódica); MURAMETIDE™ (Nac-Mur-L-Ala-D-Gln-OCH₃); MU-RAPALMITINE™ y D-MURAPALMITINE™ (Nac-Mur-L-Thr-D-isoGln-sn-gliceroldipalmitoil); NAGO (neuraminidasa-galactosa oxidasa); nanoesferas o nanopartículas de cualquier composición; NISVs (vesículas tensioactivas no iónicas); PLEURAN™ (β-glucano); PLGA, PGA y PLA (homo- y copolímeros de ácido láctico y ácido glicólico; microesferas/nanoesferas); PLURONIC L121™; PMMA (metacrilato de polimetilo); PODDS™ (microesferas de proteinoide); derivados de carbamato de polietileno; poli-rA: poli-rU (complejo de ácido poliadenílico-ácido poliuridílico); polisorbato 80 (Tween 80); cocleatos de proteína (Avanti Polar Lipids, Inc., Alabaster, AL); STIMULON™ (QS-21); Quil-A (Quil- A saponina); S-28463 (4-amino-otec-dimetil-2-etoximetil-1H-imidazo[4,5-c]quinolina-1-etanol); SAF-1™ ("formulación adyuvante Syntex"); proteoliposomas de Sendai y matrices de lípido que contienen lípidos; Span-85 (trioleato de sorbitano); Specol (emulsión de Marcol 52, Span 85 y Tween 85); escualeno o Robane® (2,6,10,15,19,23-hexametiltetracosano y 2,6,10,15,19,23-hexametil-2,6,10,14,18,22-tetracosahexano); esteariltirosina (clorhidrato de octadeciltirosina); Theramid® (N-acetilglucosaminil-N-acetilmuramil-L-Ala-D-isoGlu-L-Ala-dipalmitoxipropilamida); teronil-MDP (Termurtide™ o [thr 1]-MDP; N-acetilmuramil-L-treonil-D-isoglutamina); partículas Ty (Ty-VLPs o partículas similares a virus); liposomas Walter-Reed (liposomas que contienen lípido A adsorbido sobre hidróxido de aluminio), y lipopéptidos, incluyendo Pam3Cys, en particular sales de aluminio, tales como Adju-phos, Alhydrogel, Rehydralgel; emulsiones, incluyendo CFA, SAF, IFA, MF59, Provax, TiterMax, Montanide, Vaxfectin; copolímeros, incluyendo Optivax (CRL1005), L121, Poloaxmer4010), etc.; liposomas, incluyendo Stealth, cocleatos, incluyendo BIORAL; adyuvantes derivados de plantas, incluyendo QS21, Quil A, Iscomatrix, ISCOM; adyuvantes adecuados para la coestimulación, incluyendo Tomatina, biopolímeros, incluyendo PLG, PMM, Inulina, adyuvantes derivados de microbios, incluyendo Romurtide, DETOX, MPL, CWS, Manosa, secuencias de ácido nucleico CpG, CpG7909, ligandos de TLR 1-10 humano, ligandos de TLR 1-13 murino, ISS-1018, 35 IC31, imidazoquinolinas, Ampligen, Ribi529, IMOxine, IRIVs, VLPs, toxina colérica, toxina lábil al calor, Pam3Cys, flagelina, anclaje GPI, LNFPIII/Lewis X, péptidos antimicrobianos, UC-1V150, proteína de fusión RSV, cdiGMP; y adyuvantes adecuados como antagonistas incluyendo neuropéptidos CGRP.

También se pueden seleccionar adyuvantes adecuados de entre compuestos catiónicos o policatiónicos, preparándose el adyuvante preferiblemente después de formar complejos de los ARN de la composición inmunoestimuladora activa de la invención con el compuesto catiónico o policatiónico. La asociación o la formación de complejos del ARN de la composición inmunoestimuladora activa con compuestos catiónicos o policatiónicos tal como se definen aquí preferiblemente proporcionan propiedades adyuvantes y confieren un efecto estabilizador al ARN o a los ARN de la composición inmunoestimuladora activa. De forma particularmente preferente, estos compuestos catiónicos o policatiónicos se seleccionan entre péptidos o proteínas catiónicos o policatiónicos, incluyendo protamina, nucleolina, espermina o espermidina, u otros péptidos o proteínas catiónicos, tales como poli-L-lisina (PLL), poli-arginina, polipéptidos básicos, péptidos penetrantes de células (CPP), incluyendo péptidos de unión de VIH, Tat, VIH-1 Tat (VIH), péptidos derivados de Tat, penetratina,

- péptidos derivados de VP22 o análogos, HSV VP22 (herpes simplex), MAP, KALA o dominios de transducción de proteínas (PTD), PpT620, péptidos ricos en prolina, péptidos ricos en arginina, péptidos ricos en lisina, péptido(s) de MPG, Pep-1, L-oligómeros, péptido(s) de calcitonina, péptidos derivados de Antennapedia (en particular de *Drosophila antennapedia*), pAntp, pIsl, FGF, lactoferrina, transportano, buforina-2, Bac715-24, SynB, SynB(1), pVEC, péptidos derivados de hCT, SAP, protamina, espermina, espermidina o histonas. Otros compuestos catiónicos o policatiónicos preferentes pueden incluir polisacáridos catiónicos, por ejemplo quitosano, polibreno, polímeros catiónicos, por ejemplo polietilenoimina (PEI), lípidos catiónicos, por ejemplo DOTMA: cloruro de [1-(2,3-sioleiloxi)propil]-N,N,N-trimetilamonio, DMRIE, di-C14-amidina, DOTIM, SAINT, DC-Chol, BGTC, CTAP, DOPC, DODAP, DOPE: dioleil-fosfatidiletanol-amina, DOSPA, DODAB, DOIC, DMEPC, DOGS: dioctadecilamidoglicilespermina, DIMRI: bromuro de dimiristo-oxipropil-dimetil-hidroxietyl-amonio, DOTAP: dioleoiloxi-3-(trimetilamonio)propano, DC-6-14: cloruro de O,O-ditetradecanoil-N-(α -trimetilamonioacetil)dietanolamina, CLIP1: cloruro de rac-[(2,3-dioctadeciloxipropil)-(2-hidroxietyl)]dimetilamonio, CLIP6: rac-[2(2,3-dihexadeciloxipropiloximetiloxi)-etil]trimetilamonio, CLIP9: rac-[2(2,3-dihexadeciloxipropil-oxisucciniloxi)etil]-trimetilamonio, oligofectamina, o polímeros catiónicos o policatiónicos, por ejemplo poliaminoácidos modificados, tales como polímeros de β -aminoácido o poliamidas inversas, etc., polietilenos modificados, tales como PVP (bromuro de (poli)N-etil-4-vinilpiridinio), etc., acrilatos modificados, tales como pDMAEMA (metacrilato de (poli)dimetilaminoetilo), etc., amidoaminas modificadas, tales como pAMAM ((poli)amidoamina), etc., polibetaaminoésteres modificados (PBAE), tales como polímeros de 1,4 butanodiol diacrilato-co-5-amino-1-pentanol modificados en el extremo con diamina, etc., dendrímeros, tales como dendrímeros de polipropilamina o dendrímeros basados en pAMAM, etc., poliimina(s), tales como PEI: (poli)etilenoimina, (poli)propilenoimina, etc., polialilamina, polímeros basados en esqueleto de azúcar, tales como polímeros basados en ciclodextrina, polímeros basados en dextrano, quitosano, etc., polímeros basados en esqueleto de silano, tales como copolímeros de PMOXA-PDMS, etc., polímeros en bloque consistentes en una combinación de uno o más bloques catiónicos (por ejemplo seleccionados entre un polímero catiónico tal como se menciona más arriba) y de uno o más bloques hidrófilos o hidrófobos (por ejemplo polietilenglicol); etc.

- Adicionalmente, péptidos o proteínas catiónicos o policatiónicos preferentes, que pueden ser utilizados como adyuvante mediante la formación de complejos de los ARN de la composición inmunoestimuladora activa, se pueden seleccionar entre los siguientes péptidos o proteínas que tienen la siguiente fórmula total (I): $(Arg)_l;(Lys)_m;(His)_n;(Orn)_o;(Xaa)_x$, donde $l + m + n + o + x = 8-15$, y l, m, n u o pueden ser, independientemente entre sí, cualquier número seleccionado entre 0, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14 o 15, con la condición de que el contenido global de Arg, Lys, His y Orn represente al menos un 50% de todos los aminoácidos del oligopéptido; y Xaa puede ser cualquier aminoácido seleccionado entre aminoácidos nativos (= naturales) o no nativos, excepto Arg, Lys, His u Orn; y x puede ser cualquier número seleccionado entre 0, 1, 2, 3 o 4, con la condición de que el contenido global de Xaa no sobrepase el 50% de todos los aminoácidos del oligopéptido. En este contexto, oligoargininas particularmente preferentes son, por ejemplo, Arg₇, Arg₈, Arg₉, Arg₇, H₃R₉, R₉H₃, H₃R₉H₃, YSSR₉SSY, (RKH)₄, Y(RKH)₂R, etc.

- Además se pueden seleccionar adyuvantes adecuados de entre ácidos nucleicos de fórmula (II): G_lX_mG_n, donde: G es guanosina, uridina o un análogo de guanosina o uridina; X es guanosina, uridina, adenosina, timidina, citidina o un análogo de los nucleótidos arriba mencionados; l es un número entero del 1 al 40, donde, cuando l = 1, G es guanosina o un análogo de la misma, cuando l > 1, al menos un 50% de los nucleótidos son guanosina o un análogo de la misma; m es un número entero y es al menos 3; donde, cuando m = 3, X es uridina o un análogo de la misma, cuando m > 3, están presentes al menos 3 uridinas o análogos de uridina sucesivos; n es un número entero del 1 al 40, donde, cuando n = 1, G es guanosina o un análogo de la misma, cuando n > 1, al menos un 50% de los nucleótidos son guanosina o un análogo de la misma.

- Otros adyuvantes adecuados se pueden seleccionar además de entre ácidos nucleicos de fórmula (III): C_lX_mC_n, donde: C es citidina, uridina o un análogo de citidina o uridina; X es guanosina, uridina, adenosina, timidina, citidina o un análogo de los nucleótidos arriba mencionados; l es un número entero del 1 al 40, donde, cuando l = 1, C es citidina o un análogo de la misma, cuando l > 1, al menos un 50% de los nucleótidos son citidina o un análogo de la misma; m es un número entero y es al menos 3; donde, cuando m = 3, X es uridina o un análogo

de la misma, cuando $m > 3$, están presentes al menos 3 uridinas o análogos de uridina sucesivos; n es un número entero del 1 al 40, donde, cuando $n = 1$, C es citidina o un análogo de la misma, cuando $n > 1$, al menos un 50% de los nucleótidos son citidina o un análogo de la misma.

- De acuerdo con una realización preferente, la presente invención puede proporcionar además una vacuna que
- 5 contiene la composición inmunoestimuladora activa de acuerdo con la invención. La vacuna de la invención puede contener adicionalmente un soporte farmacéuticamente aceptable y/u otras sustancias auxiliares y aditivos y/o adyuvantes. De acuerdo con una realización particularmente preferente, los antígenos codificados por los ARN de la composición inmunoestimuladora activa contenidos en la vacuna de la invención se seleccionan entre el grupo arriba mencionado.
- 10 La vacuna de la invención normalmente comprende una cantidad segura y eficaz de los ARN de la composición inmunoestimuladora activa tal como se define más arriba que codifica cuatro antígenos tal como se definen más arriba. Tal como se utiliza aquí, una "cantidad segura y eficaz" significa una cantidad de los ARN de la composición inmunoestimuladora activa en la vacuna tal como se define más arriba, que es suficiente para inducir de forma significativa una modificación positiva del cáncer de próstata (PCa), preferiblemente de cánceres de
- 15 próstata refractarios a la terapia neoadyuvante y/u hormonal y enfermedades o afecciones relacionadas con los mismos. Sin embargo, al mismo tiempo, una "cantidad segura y eficaz" es lo suficientemente pequeña para evitar efectos secundarios graves, es decir, para permitir una relación razonable entre ventajas y riesgos. La determinación de estos límites está normalmente dentro del alcance del criterio médico razonable. En relación con la vacuna de la invención, la expresión "cantidad segura y eficaz" significa preferiblemente una cantidad del
- 20 ARN (y por tanto de los antígenos codificados) adecuada para estimular el sistema inmunitario adaptativo de forma que no se produzcan reacciones inmunitarias excesivas o dañinas, pero preferiblemente tampoco reacciones inmunitarias por debajo de un nivel mensurable. Dicha "cantidad segura y eficaz" de los ARN de la composición inmunoestimuladora activa en la vacuna tal como se define más arriba se puede seleccionar además en función del tipo de ARN, por ejemplo ARN monocistrónico, bicistrónico o incluso multicistrónico, dado que un
- 25 ARN bicistrónico o incluso multicistrónico puede conducir a una expresión considerablemente más alta del antígeno o los antígenos codificados que cuando se utiliza una cantidad igual de un ARN monocistrónico. Una "cantidad segura y eficaz" de los ARN de la composición inmunoestimuladora activa tal como se define más arriba, que está contenida en la vacuna de la invención, variará además en relación con la afección particular a ser tratada y también con la edad y la condición física del paciente a tratar, la gravedad de la afección, la duración del tratamiento, la naturaleza de la terapia acompañante, del soporte farmacéuticamente aceptable particular utilizado y factores similares, dentro del conocimiento y la experiencia del médico acompañante. La vacuna de acuerdo con la invención puede emplearse de acuerdo con la invención para fines médicos en humanos y también en veterinaria, como una composición farmacéutica o como una vacuna.
- 30 La vacuna de acuerdo con la invención típicamente contiene un soporte farmacéuticamente aceptable. La expresión "soporte farmacéuticamente aceptable" tal como se utiliza aquí incluye preferiblemente la base líquida o no líquida de la vacuna de la invención. Si la vacuna de la invención se proporciona en forma líquida, el soporte será normalmente agua libre de pirógenos; soluciones (acuosas) salinas isotónicas o tamponadas, por ejemplo soluciones tamponadas con fosfato, citrato, etc. En particular, para la inyección de la vacuna de la invención se puede utilizar agua o preferiblemente un tampón, de forma especialmente preferible un tampón acuoso que
- 40 contiene una sal de sodio, preferiblemente al menos 50 mM de una sal de sodio, una sal de calcio, preferiblemente al menos 0,01 mM de una sal de calcio, y opcionalmente una sal de potasio, preferiblemente al menos 3 mM de una sal de potasio. De acuerdo con una realización preferente, las sales de sodio, calcio y opcionalmente potasio pueden estar en forma de sus haluros, por ejemplo cloruros, yoduros o bromuros, en forma de sus hidróxidos, carbonatos, bicarbonatos o sulfatos, etc. De forma no limitativa, ejemplos de sales de
- 45 sodio incluyen NaCl, NaI, NaBr, Na_2CO_3 , NaHCO_3 , Na_2SO_4 , ejemplos de sales de potasio opcionales incluyen, KCl, KI, KBr, K_2CO_3 , KHCO_3 , K_2SO_4 , y ejemplos de sales de calcio incluyen CaCl_2 , CaI_2 , CaBr_2 , CaCO_3 , CaSO_4 , $\text{Ca}(\text{OH})_2$. Además, el tampón puede contener aniones orgánicos de los cationes arriba mencionados. De acuerdo con una realización especialmente preferente, el tampón adecuado para fines de inyección tal como se define más arriba puede contener sales seleccionadas entre cloruro de sodio (NaCl), cloruro de calcio (CaCl_2) y

opcionalmente cloruro de potasio (KCl), pudiendo haber más aniones presentes además de los cloruros. El CaCl_2 también puede ser sustituido por otra sal como KCl. Normalmente, las sales del tapón de inyección están presentes en una concentración de cloruro de sodio (NaCl) al menos 50 mM, cloruro de potasio (KCl) al menos 3 mM y cloruro de calcio (CaCl_2) al menos 0,01 mM. El tampón de inyección puede ser hipertónico, isotónico o hipotónico con respecto al medio de referencia específico, es decir, el tampón puede tener un contenido de sal más alto, igual o más bajo en comparación con el medio de referencia particular, pudiendo emplearse preferiblemente concentraciones de las sales arriba mencionadas que no conducen a daños en las células provocados por ósmosis u otros efectos de concentración. Medios de referencia son, por ejemplo, líquidos presentes en métodos "*in vivo*", por ejemplo sangre, linfa, líquidos citosólicos u otros líquidos corporales, o líquidos que pueden ser utilizados como medios de referencia en métodos "*in vitro*", tales como tampones o líquidos comunes. Los expertos en la técnica conocen estos tampones o líquidos. La solución de Ringer-lactato es particularmente preferible como base líquida.

No obstante, también se pueden utilizar uno o más materiales de carga o diluyentes sólidos o líquidos o compuestos de encapsulación compatibles, que sean adecuados para ser administrados a una persona. El término "compatible", tal como se utiliza aquí, significa que los constituyentes de la vacuna de la invención pueden ser mezclados con los ARN de la composición inmunoestimuladora activa, que codifica los antígenos tal como se definen más arriba, de forma que no se produce ninguna interacción que pueda reducir sustancialmente la eficacia farmacéutica de la vacuna de la invención bajo condiciones de uso normales. Evidentemente, los soportes, materiales de carga y diluyentes farmacéuticamente aceptables deben tener una pureza suficientemente alta y una toxicidad suficientemente baja para que sean adecuados para ser administrados a una persona a tratar. Ejemplos de compuestos que pueden emplearse como soportes, materiales de carga o constituyentes farmacéuticamente aceptables de los mismos son azúcares, tales como lactosa, glucosa y sacarosa; almidones, por ejemplo almidón de maíz o almidón de patata; celulosa y sus derivados, por ejemplo carboximetilcelulosa de sodio, etilcelulosa, acetato de celulosa; tragacanto pulverizado; malta; gelatina; sebo; lubricantes sólidos, por ejemplo ácido esteárico, estearato de magnesio; sulfato de calcio; aceites vegetales, por ejemplo aceite de cacahuete, aceite de semilla de algodón, aceite de sésamo, aceite de oliva, aceite de maíz y aceite de teobroma; polioles, por ejemplo propilenglicol, glicerol, sorbitol, manitol y polietilenglicol; ácido alginico.

La selección de un soporte farmacéuticamente aceptable está determinada en principio por el modo en el que se administra la vacuna de la invención. La vacuna de la invención se puede administrar, por ejemplo, de forma sistémica o local. Las vías para la administración sistémica incluyen, por ejemplo, las vías transdérmica, oral, parenteral, incluyendo inyecciones subcutáneas, intravenosas, intramusculares, intraarteriales, intradérmicas e intraperitoneales y/o vías de administración intranasal. En general, las vías para la administración local incluyen, por ejemplo, vías de administración tópica, pero también inyecciones intradérmicas, transdérmicas, subcutáneas o intramusculares, o inyecciones intralesionales, intracraneales, intrapulmonares, intracardíacas y sublinguales. De forma especialmente preferible, las vacunas se pueden administrar vía intradérmica, subcutánea o intramuscular. Por tanto, las composiciones/vacunas se formulan preferiblemente en forma líquida o sólida. La cantidad adecuada de la vacuna de la invención a administrar se puede determinar mediante experimentos rutinarios con modelos animales. Estos modelos incluyen, de forma no limitativa, modelos de conejo, oveja, ratón, rata, perro y primates no humanos. Las formas de dosis unitaria preferentes para inyección incluyen soluciones estériles de agua, solución salina fisiológica o mezclas de las mismas. El pH de estas soluciones debe ajustarse a aproximadamente 7,4. Los soportes adecuados para inyección incluyen hidrogeles, dispositivos de liberación controlada o retardada, ácido poliláctico y matrices de colágeno. Los soportes farmacéuticamente aceptables para la aplicación tópica incluyen aquellos que son adecuados para su uso en lociones, cremas, geles y similares. Si la vacuna de la invención se debe administrar vía peroral, la forma de dosis unitaria preferente consiste en pastillas, cápsulas y similares. Los soportes farmacéuticamente aceptables para la preparación de formas de dosis unitaria que pueden ser utilizadas para la administración oral son bien conocidos en el estado anterior de la técnica. Su elección dependerá de consideraciones secundarias, como el sabor, el coste y la estabilidad de almacenamiento, que no son críticas para los objetivos de la presente invención, y puede ser realizada sin dificultad por los expertos en la técnica.

La vacuna de la invención puede contener además una o más sustancias auxiliares para aumentar adicionalmente la inmunogenicidad. Así, preferiblemente se logra una acción sinérgica entre el al menos un ARN de la composición inmunoestimuladora activa tal como se define más arriba y una sustancia auxiliar que también puede estar contenida opcionalmente en la vacuna de la invención tal como se describe más arriba. A este respecto, dependiendo de los diversos tipos de sustancias auxiliares pueden entrar en consideración diversos mecanismos. Por ejemplo, una primera clase de sustancias auxiliares adecuadas está formada por compuestos que permiten la maduración de células dendríticas (DC), por ejemplo lipopolisacáridos, TNF-alfa o ligando CD40. En general, como sustancia auxiliar se puede utilizar cualquier agente que influya en el sistema inmunitario a modo de una "señal de peligro" (LPS, GP96, etc.) o citoquinas, tal como GM-CSF, que permiten mejorar la respuesta inmunitaria producida por el adyuvante inmunoestimulador de acuerdo con la invención y/o influir de forma dirigida en la misma. Sustancias auxiliares particularmente preferentes son citoquinas, tales como monoquinas, linfoquinas, interleuquinas o quimioquinas, que - adicionalmente a la inducción de la respuesta inmunitaria adaptativa por los al menos dos antígenos codificados - promueven la respuesta inmunitaria innata, tales como IL-1, IL-2, IL-3, IL-4, IL-5, IL-6, IL-7, IL-8, IL-9, IL-10, IL-12, IL-13, IL-14, IL-15, IL-16, IL-17, IL-18, IL-19, IL-20, IL-21, IL-22, IL-23, IL-24, IL-25, IL-26, IL-27, IL-28, IL-29, IL-30, IL-31, IL-32, IL-33, IFN-alfa, IFN-beta, IFN-gamma, GM-CSF, G-CSF, M-CSF, LT-beta o TNF-alfa, factores de crecimiento tales como hGH.

Otros aditivos que pueden ser incluidos en la vacuna de la invención son emulsionantes, por ejemplo Tween®, agentes humectantes, tales como laurilsulfato de sodio; agentes colorantes; agentes saborizantes, soportes farmacéuticos; agentes formadores de comprimidos; estabilizadores; antioxidantes; conservantes.

La vacuna de la invención también puede contener adicionalmente cualquier otro compuesto conocido por ser inmunoestimulador debido a su afinidad de unión (como ligando) con receptores de tipo Toll humanos TLR1, TLR2, TLR3, TLR4, TLR5, TLR6, TLR7, TLR8, TLR9, TLR10, o debido a su afinidad de unión (como ligandos) con receptores de tipo Toll murinos TLR1, TLR2, TLR3, TLR4, TLR5, TLR6, TLR7, TLR8, TLR9, TLR10, TLR11, TLR12 o TLR13.

Otra clase de compuestos que pueden añadirse a la vacuna de la invención en este contexto pueden ser ácidos nucleicos CpG, en particular CpG-ARN o CpG-ADN. Un CpG-ARN o CpG-ADN puede ser un CpG-ADN monocatenario (CpG-ADN ss), un CpG-ADN bicatenario (ADNs), un CpG-ARN monocatenario (CpG-ARN ss) o un CpG-ARN bicatenario (CpG-ARN ds). El ácido nucleico CpG está preferiblemente en forma de CpG-ARN, de forma especialmente preferible en forma de CpG-ARN monocatenario (CpG-ARN ss). El ácido nucleico CpG preferiblemente contiene al menos una o más secuencias de los dinucleótidos citosina/guanina (mitógenas) (motivos CpG). De acuerdo con una primera alternativa, al menos un motivo CpG contenido en estas secuencias, es decir la C (citosina) y la G (guanina) del motivo CpG, no está metilado. todas las demás citosinas o guaninas opcionalmente contenidas en estas secuencias pueden estar metiladas o no metiladas. No obstante, de acuerdo con otra alternativa preferente, la C (citosina) y la G (guanina) del motivo CpG también pueden estar presentes en forma metilada.

De acuerdo con otro objeto preferente de la presente invención, la composición inmunoestimuladora activa de la invención puede emplearse (para la preparación de una vacuna de acuerdo con la presente invención) para el tratamiento del cáncer de próstata (PCa), preferiblemente de cánceres de próstata refractarios a la terapia neoadyuvante y/u hormonal, y enfermedades o afecciones relacionadas con éstos.

De acuerdo con otro objeto preferente de la presente invención, la vacuna de la invención o los ARN que codifican los antígenos diferentes tal como se define aquí pueden emplearse para el tratamiento del cáncer de próstata (PCa), preferiblemente de cánceres de próstata refractarios a la terapia neoadyuvante y/u hormonal, y enfermedades o afecciones relacionadas con éstos.

En este contexto, en la presente invención también está incluido el uso para métodos de tratamiento del cáncer de próstata (PCa), preferiblemente de cánceres de próstata refractarios a la terapia neoadyuvante y/u hormonal, y enfermedades o afecciones relacionadas con éstos, mediante la administración a un paciente que lo necesite de una cantidad farmacéuticamente eficaz de una vacuna de la invención, o de una cantidad farmacéuticamente eficaz de una composición inmunoestimuladora activa de la invención. El uso de dicho método normalmente

comprende una primera etapa opcional de preparación de la composición inmunoestimuladora activa de la invención o de la vacuna de la invención, y una segunda etapa que comprende la administración (de una cantidad farmacéuticamente eficaz) de dicha composición inmunoestimuladora activa de la invención o de dicha vacuna de la invención a un paciente que lo necesite. Un paciente que lo necesite será normalmente cualquier mamífero.

5 En el contexto de la presente invención, un mamífero es preferiblemente un mamífero seleccionado entre el grupo que comprende, de forma no limitativa, por ejemplo cabra, ganado bovino, cerdo, perro, gato, burro, mono, simio, un roedor tal como ratón, hámster, conejo y, en particular, humano, y el animal normalmente sufre de cáncer de próstata (PCa), preferiblemente cánceres de próstata refractarios a la terapia neoadyuvante y/u hormonal, y enfermedades o afecciones relacionadas con éstos.

10 La invención también se refiere al uso de la composición inmunoestimuladora activa de la invención o los cuatro ARN que codifican los antígenos diferentes tal como se definen aquí (para la preparación de una vacuna de la invención), para provocar una respuesta inmunitaria en un mamífero, o para el tratamiento del cáncer de próstata (PCa), de forma especialmente preferible de cánceres de próstata refractarios a la terapia neoadyuvante y/u hormonal, y enfermedades o afecciones relacionadas con éstos.

15 Similarmente, la invención también se refiere al uso de la vacuna de la invención *per se* o de los cuatro ARN que codifican los antígenos diferentes tal como se definen aquí para provocar una respuesta inmunitaria adaptativa en un mamífero o para el tratamiento del cáncer de próstata (PCa), preferiblemente de cánceres de próstata refractarios a la terapia neoadyuvante y/u hormonal, y enfermedades o afecciones relacionadas con éstos.

20 La prevención o el tratamiento del cáncer de próstata (PCa), preferiblemente de cánceres de próstata refractarios a la terapia neoadyuvante y/u hormonal, y enfermedades o afecciones relacionadas con éstos, se puede llevar a cabo administrando la composición inmunoestimuladora activa de la invención y/o la vacuna de la invención en una sola vez o de forma escalonada en el tiempo, por ejemplo como un *kit* de partes, conteniendo cada parte al menos un antígeno preferiblemente diferente. Para la administración, preferiblemente se puede utilizar cualquiera de las vías de administración tal como se definen más arriba. Por ejemplo el cáncer de próstata (PCa),
 25 preferiblemente los cánceres de próstata refractarios a la terapia neoadyuvante y/u hormonal, y enfermedades o afecciones relacionadas con éstos, se pueden tratar induciendo o aumentando una respuesta inmunitaria adaptativa en base a los antígenos codificados por los ARN de la composición inmunoestimuladora activa de la invención. La administración de la composición inmunoestimuladora activa de la invención y/o de la vacuna de la invención puede tener lugar antes, al mismo tiempo y/o después de la administración de otra composición
 30 inmunoestimuladora activa de la invención y/o vacuna de la invención tal como se define aquí, que puede contener otra combinación de ARN que codifican antígenos diferentes, pudiendo cada antígeno codificado por el al menos un ARN de la composición inmunoestimuladora activa de la invención preferiblemente ser adecuado para la terapia del cáncer de próstata (PCa), preferiblemente de cánceres de próstata refractarios a la terapia neoadyuvante y/u hormonal, y enfermedades o afecciones relacionadas con éstos. En este contexto, una terapia
 35 tal como se define aquí también puede comprender la modulación de una enfermedad asociada al cáncer de próstata (PCa), preferiblemente de cánceres de próstata refractarios a la terapia neoadyuvante y/u hormonal, y enfermedades o afecciones relacionadas con éstos.

De acuerdo con otra realización, la presente invención comprende además el uso de la composición inmunoestimuladora activa de la invención o de los ARN que codifican los antígenos diferentes tal como se
 40 definen aquí (para la preparación de una vacuna (de la invención)) para modular, preferiblemente para inducir o mejorar una respuesta inmunitaria en un mamífero tal como se define más arriba, o para tratar y/o apoyar el tratamiento del cáncer de próstata (PCa), preferiblemente de cánceres de próstata refractarios a la terapia neoadyuvante y/u hormonal, y enfermedades o afecciones relacionadas con éstos. En este contexto, el apoyo del tratamiento del cáncer de próstata (PCa) puede consistir en cualquier combinación de un método de terapia
 45 de cáncer de próstata convencional, tal como cirugía, radioterapia, terapia hormonal, ocasionalmente quimioterapia, terapia protónica o alguna combinación de éstas, y una terapia en la que se utilice la composición inmunoestimuladora activa de la invención tal como se define aquí. También se puede prever el apoyo del tratamiento del cáncer de próstata (PCa) en cualquiera de las otras realizaciones aquí definidas.

La administración de la composición inmunoestimuladora activa de la invención o los ARN que codifican los antígenos diferentes tal como se definen aquí o de la vacuna de la invención se puede llevar a cabo en un tratamiento escalonado en el tiempo. Un tratamiento escalonado en el tiempo puede ser, por ejemplo, la administración de la composición inmunoestimuladora activa de la invención o los ARN que codifican los antígenos diferentes tal como se definen aquí o la vacuna de la invención antes, al mismo tiempo y/o después de una terapia convencional del cáncer de próstata (PCa), preferiblemente de cánceres de próstata refractarios a la terapia neoadyuvante y/u hormonal, y enfermedades o afecciones relacionadas con éstos, por ejemplo mediante la administración del medicamento de la invención o la composición inmunoestimuladora activa o vacuna de la invención antes, al mismo tiempo y/o después de una terapia o una administración de un agente terapéutico adecuado para el tratamiento del cáncer de próstata (PCa), preferiblemente de cánceres de próstata refractarios a la terapia neoadyuvante y/u hormonal, y enfermedades o afecciones relacionadas con éstos. Este tratamiento escalonado en el tiempo se puede llevar a cabo utilizando, por ejemplo, un *kit*, preferiblemente un *kit* de partes tal como se define más abajo.

El tratamiento escalonado también puede comprender adicional o alternativamente una administración de la composición inmunoestimuladora activa o vacuna de la invención, preferiblemente de los ARN que codifican antígenos diferentes tal como se definen más arriba, en una forma en la que los ARN que codifican los antígenos tal como se definen más arriba, que preferiblemente forman parte de la composición inmunoestimuladora activa o vacuna de la invención, son administrados paralelamente, antes o después de al menos otro ARN que codifica al menos dos antígenos (preferiblemente diferentes) tal como se definen más arriba y que preferiblemente forma parte de la misma composición inmunoestimuladora activa o vacuna de la invención. Preferiblemente, la administración (de todos los ARN) tiene lugar en un plazo de una hora, de forma especialmente preferible en un plazo de 30 minutos, de forma incluso más preferible en un plazo de 15, 10, 5, 4, 3 o 2 minutos o incluso en un plazo de 1 minuto. Este tratamiento escalonado en el tiempo se puede llevar a cabo utilizando, por ejemplo, un *kit*, preferiblemente un *kit* de partes tal como se define más abajo.

De acuerdo con una realización final, la presente invención también proporciona *kits*, en particular *kits* de partes, que comprenden la composición inmunoestimuladora activa de la invención y/o la vacuna de la invención, y opcionalmente instrucciones técnicas con información sobre la administración y la posología de la composición inmunoestimuladora activa de la invención y/o de la vacuna de la invención. Las instrucciones técnicas pueden contener información sobre la administración y la posología de la composición inmunoestimuladora activa de la invención y/o la vacuna de la invención. Estos *kits*, preferiblemente *kits* de partes, se pueden aplicar por ejemplo a cualquiera de las aplicaciones o usos arriba mencionados, preferiblemente para el uso de al menos una composición inmunoestimuladora activa de la invención (para la preparación de un medicamento de la invención, preferiblemente una vacuna) para el tratamiento del cáncer de próstata (PCa), preferiblemente de cánceres de próstata refractarios a la terapia neoadyuvante y/u hormonal, y enfermedades o afecciones relacionadas con éstos. Los *kits* también se pueden aplicar al uso de al menos una composición inmunoestimuladora activa de la invención (para la preparación de una vacuna de la invención) para el tratamiento del cáncer de próstata (PCa), preferiblemente de cánceres de próstata refractarios a la terapia neoadyuvante y/u hormonal, y enfermedades o afecciones relacionadas con éstos, pudiendo la composición inmunoestimuladora activa y/o la vacuna de la invención, debido a los cuatro antígenos codificados, inducir o aumentar una respuesta inmunitaria en un mamífero tal como se define más arriba. Estos *kits* también se pueden aplicar al uso de al menos una composición inmunoestimuladora activa de la invención (para la preparación de un medicamento de la invención, preferiblemente una vacuna) para modular, preferiblemente provocar, por ejemplo para inducir o aumentar, una respuesta inmunitaria en un mamífero tal como se define más arriba, y preferiblemente para apoyar el tratamiento del cáncer de próstata (PCa), preferiblemente de cánceres de próstata refractarios a la terapia neoadyuvante y/u hormonal, y enfermedades o afecciones relacionadas con éstos. Los *kits* de partes, como una forma especial de *kits*, pueden contener una o más composiciones inmunoestimuladoras activas de la invención idénticas o diferentes y/o una o más vacunas de la invención idénticas o diferentes en diferentes partes del *kit*. Los *kits* de partes también pueden contener por ejemplo una composición inmunoestimuladora activa de la invención, por ejemplo una vacuna de la invención, y/o el al menos un ARN que codifica al menos un antígeno tal como se

define más arriba en diferentes partes del *kit*, por ejemplo conteniendo cada parte del *kit* al menos un ARN que codifica un antígeno preferiblemente diferente. Adicionalmente, también es posible una combinación de los dos tipos de *kits* de partes. Los *kits* de partes pueden emplearse, por ejemplo, cuando está previsto un tratamiento escalonado en el tiempo, por ejemplo cuando se utilizan diferentes formulaciones y/o concentraciones crecientes de la composición inmunoestimuladora activa de la invención, la vacuna de la invención y/o los ARN que codifican los antígenos tal como se definen más arriba, durante el mismo tratamiento *in vivo*. Los *kits* de partes también pueden utilizarse cuando está prevista o es necesaria (por ejemplo por razones técnicas) una formulación o administración separada de los diferentes antígenos de la composición inmunoestimuladora activa de la invención (es decir, en partes), pero por ejemplo sigue siendo necesario lograr una presencia combinada de los diferentes antígenos *in vivo*. En particular están previstos *kits* de partes como una forma especial de *kits*, conteniendo cada parte del *kit* al menos un ARN que preferiblemente codifica un antígeno diferente tal como se define más arriba, formando todas las partes del *kit* de partes preferiblemente la composición inmunoestimuladora activa de la invención o la vacuna de la invención tal como se definen aquí. Estos *kits* de partes específicos pueden ser adecuados en particular por ejemplo si se formulan diferentes antígenos por separado como partes diferentes de los *kits*, pero éstos son administrados después a la vez juntos o de forma escalonada en el tiempo al mamífero que lo necesite. En este último caso, la administración de todas las partes diferentes de dicho *kit* tiene lugar normalmente dentro de un plazo de tiempo corto, de modo que todos los antígenos estén presentes en el mamífero aproximadamente al mismo tiempo después de la administración de la última parte del *kit*. En un tratamiento tal como se define más arriba se puede utilizar cualquiera de los *kits* arriba descritos.

20 **Ventajas de la presente invención**

La presente invención proporciona una composición inmunoestimuladora activa para el tratamiento del cáncer de próstata (PCa), comprendiendo la composición cuatro ARN, preferiblemente ARNm, que codifican cada uno antígenos diferentes capaces de provocar una respuesta inmunitaria (adaptativa) en un mamífero, seleccionándose los antígenos entre el grupo consistente en PSA (antígeno prostático específico), PSMA (antígeno de membrana específico de próstata), PSCA (antígeno de células madre de próstata), y STEAP (antígeno epitelial de seis dominios transmembrana de la próstata). Esta composición inmunoestimuladora activa posibilita un tratamiento eficiente del cáncer de próstata (PCa) o un tratamiento suplementario cuando se utilizan terapias convencionales. Además, evita el problema de una propagación incontrolada de las secuencias de ADN introducidas mediante el uso de ARN como una estrategia para métodos curativos. El ARN tal como se utiliza en la composición inmunoestimuladora activa de la invención tiene considerables ventajas adicionales sobre los sistemas de expresión de ADN, por ejemplo respuesta inmunitaria, inmunización o vacunación. Estas ventajas incluyen, entre otras, que el ARN introducido en una célula no se integra en el genoma. Esto evita el riesgo de mutación de este gen, que en otro caso puede resultar completa o parcialmente inactivado o puede dar lugar a información errónea. También evita otros riesgos del uso de ADN como agente para inducir una respuesta inmunitaria (por ejemplo como vacuna), tal como la inducción de anticuerpos anti-ADN patógenos en el paciente en el que se ha introducido el ADN extraño, provocando así una respuesta inmunitaria (posiblemente fatal). En cambio, todavía no se ha detectado ningún anticuerpo anti-ARN.

Figuras

Las siguientes figuras están concebidas para ilustrar adicionalmente la invención.

- 40 **Figura 1:** muestra el constructo del plásmido RNaive CAP-KLK3(GC)-muag-A70-C30 (SEQ ID N°: 1), que codifica PSA (antígeno prostático específico) (= KLK3). El constructo contiene los siguientes elementos de secuencia:
- una secuencia optimizada por GC para estabilización y un mejor uso de codones
 - ~ 70 x adenosina en el extremo 3'-terminal (cola de poli-A),
 - ~ 30 x citidina en el extremo 3'-terminal (cola de poli-C).
- Este constructo de ADN corresponde al ARNm codificador y sirvió como base para la preparación del constructo de ARN correspondiente mediante experimentos de transcripción *in vitro*.

- Figura 2:** muestra la secuencia codificadora *de tipo silvestre* correspondiente al constructo de ARN RActive CAP- KLK3(GC)-muag-A70-C30 (SEQ ID NO: 2), que codifica PSA (antígeno prostático específico) (= KLK3), es decir, la secuencia codificadora (CDS) que codifica PSA (antígeno prostático específico) sin secuencia optimizada por GC.
- 5 **Figura 3:** muestra la secuencia codificadora optimizada por GC del constructo de ARN RActive CAP- KLK3(GC)-muag-A70-C30 (SEQ ID NO: 3), que codifica PSA (antígeno prostático específico) (= KLK3), es decir, la secuencia codificadora (CDS) que codifica PSA (antígeno prostático específico) con secuencia optimizada por GC.
- 10 **Figura 4:** muestra el constructo de plásmido RActive CAP-FOLH1(GC)-muag-A70-C30 (SEQ ID NO: 4), que codifica PSMA (antígeno de membrana específico de próstata) (= FOLH1). El constructo contiene los siguientes elementos de secuencia:
una secuencia optimizada por GC para estabilización y un mejor uso de codones
~ 70 x adenosina en el extremo 3'-terminal (cola de poli-A),
30 x citidina en el extremo 3'-terminal (cola de poli-C).
- 15 Este constructo de ADN corresponde al ARNm codificador y sirvió como base para la generación del constructo de ARN correspondiente mediante experimentos de transcripción *in vitro*.
- Figura 5:** muestra la secuencia codificadora *de tipo silvestre* correspondiente al constructo de ARN RActive CAP-FOLH1(GC)-muag-A70-C30 (SEQ ID NO: 5), que codifica PSMA (antígeno de membrana específico de próstata) (= FOLH1), es decir, la secuencia codificadora (CDS) que codifica PSMA (antígeno de membrana específico de próstata) (= FOLH1) sin secuencia optimizada por GC.
- 20 **Figura 6:** muestra la secuencia codificadora optimizada por GC del constructo de ARN RActive CAP-FOLH1(GC)-muag-A70-C30 (SEQ ID NO: 6), que codifica PSMA (antígeno de membrana específico de próstata) (= FOLH1), es decir, la secuencia codificadora (CDS) que codifica PSMA (antígeno de membrana específico de próstata) (= FOLH1) con secuencia optimizada por GC.
- 25 **Figura 7:** muestra el constructo de plásmido RActive CAP-PSCA(GC)-muag-A70-C30 (SEQ ID NO: 7), que codifica PSCA (antígeno de células madre de próstata). El constructo contiene los siguientes elementos de secuencia:
una secuencia optimizada por GC para estabilización y un mejor uso de codones
~ 70 x adenosina en el extremo 3'-terminal (cola de poli-A),
30 x citidina en el extremo 3'-terminal (cola de poli-C).
- 30 Este constructo de ADN corresponde al ARNm codificador y sirvió como base para la generación del constructo de ARN correspondiente mediante experimentos de transcripción *in vitro*.
- Figura 8:** muestra la secuencia codificadora *de tipo silvestre* correspondiente al constructo de ARN RActive CAP-PSCA(GC)-muag-A70-C30 (SEQ ID NO: 8), que codifica PSCA (antígeno de células madre de próstata), es decir, la secuencia codificadora (CDS) que codifica PSCA (antígeno de células madre de próstata) sin secuencia optimizada por GC.
- 35 **Figura 9:** muestra la secuencia codificadora optimizada por GC de la construcción de ARN RActive CAP-PSCA(GC)-muag-A70-C30 (SEQ ID NO: 9), que codifica PSCA (antígeno de células madre de próstata), es decir, la secuencia codificadora (CDS) que codifica PSCA (antígeno de células madre de próstata) con secuencia optimizada por GC.
- 40 **Figura 10:** muestra el constructo de plásmido RActive CAP-STEAP(GC)-muag-A70-C30 (SEQ ID NO: 10), que codifica STEAP (antígeno epitelial de seis dominios transmembrana de la próstata). El constructo contiene los siguientes elementos de secuencia:
una secuencia optimizada por GC para estabilización y un mejor uso de codones
~ 70 x adenosina en el extremo 3'-terminal (cola de poli-A),
30 x citidina en el extremo 3'-terminal (cola de poli-C).
- 45 Este constructo de ADN corresponde al ARNm codificador y sirvió como base para la generación del constructo de ARN correspondiente mediante experimentos de transcripción *in vitro*.

Figura 11: muestra la secuencia codificadora *de tipo silvestre* correspondiente al constructo de ARN RActive CAP-STEAP(GC)-muag-A70-C30 (SEQ ID NO: 11), que codifica STEAP (antígeno epitelial de seis dominios transmembrana de la próstata), es decir, la secuencia codificadora (CDS) que codifica STEAP (antígeno epitelial de seis dominios transmembrana de la próstata) sin secuencia optimizada por GC.

Figura 12: muestra la secuencia codificadora optimizada por GC del constructo de ARN RActive CAP-STEAP(GC)-muag-A70-C30 (SEQ ID NO: 12), que codifica STEAP (antígeno epitelial de seis dominios transmembrana de la próstata), es decir, la secuencia codificadora (CDS) que codifica STEAP (antígeno epitelial de seis dominios transmembrana de la próstata) con secuencia optimizada por GC.

Figura 13: muestra la detección de una respuesta inmunitaria específica de antígeno (respuesta inmunitaria de células B) mediante la detección de anticuerpos específicos de antígeno. Como se puede ver en la Figura 13, la administración de una mezcla de ARN, es decir, de un cóctel de ARN-PCa que comprende ARNm que codifica PSA, PSMA, PSCA o STEAP, respectivamente, mostró una inducción significativa de una respuesta inmunitaria específica de antígeno (respuesta inmunitaria de células B) debido a una formación significativa de anticuerpos IgG2a contra PSA en comparación con muestras que contienen un tampón o el control.

Figura 14: muestra la detección de una respuesta inmunitaria celular específica de antígeno mediante ELISPOT. Como se puede ver en la Figura 14, la vacunación de ratones con una mezcla de ARN, es decir, de un cóctel de ARN-PCa que comprende ARNm que codifica PSA, PSMA, PSCA o STEAP, respectivamente, o con ARNm que codifica PSA, PSMA, PSCA o STEAP, respectivamente, conduce a una inducción significativa de una respuesta inmunitaria específica de antígeno (CTL) debido a una formación significativa de INF-gama en comparación con ratones nativos y ratones vacunados con tampón.

Figura 15: muestra la inmunización y la estimulación tumoral utilizando el cóctel de ARN-PCa de la invención que comprende 5 µg de ARNm que codifica PSA, PSMA, PSCA o STEAP, respectivamente. Como se puede ver en la Figura 15, el volumen tumoral se reduce significativamente después de la inmunización con el cóctel de ARN-PCa de acuerdo con a) 2x i.m. (intramuscular) que comprende ARNm que codifica PSA, PSMA, PSCA o STEAP, respectivamente. El volumen tumoral se reduce todavía más cuando el cóctel de ARN-PCa de acuerdo con a) se administra 4x i.m. (intramuscular).

Figura 16: muestra la inducción de anticuerpos IgG1 específicos de PSA. La Figura 16 muestra en particular la presencia de anticuerpos IgG1 específicos para el antígeno tumoral PSA en ratones que habían sido vacunados con la vacuna de ARNm consistente en 4 componentes, que contenían ARNm optimizados por GC que codificaban los antígenos de diferenciación de próstata humana PSMA, STEAP, PSA y PSCA. Cada uno de ellos se formuló con el péptido catiónico protamina. Los ratones de control fueron tratados bien con tampón (Ringer-lactato) o con ARN irrelevante (Pp Luc) formulado con protamina de forma análoga a la vacuna de ARNm. Para los análisis se reunieron y titularon sueros de 5 ratones de cada grupo. Las barras de error representan la desviación media de dos replicaciones con respecto al valor medio.

Figura 17: muestra la inducción de anticuerpos IgG2a específicos de PSA. La Figura 17 muestra en particular la presencia de anticuerpos IgG2a específicos para el antígeno tumoral PSA en ratones que habían sido vacunados con la vacuna de ARNm consistente en 4 componentes, que contenían en cada caso ARNm optimizados por GC que codificaban los antígenos de diferenciación de próstata humana PSMA, STEAP, PSA y PSCA. Cada uno de ellos se formuló con el péptido catiónico protamina. Los ratones de control fueron tratados bien con tampón (Ringer-lactato) o con ARN irrelevante (Pp Luc) formulado con protamina de forma análoga a la vacuna de ARNm. Para los análisis se reunieron y titularon sueros de 5 ratones de cada grupo. Las barras de error representan la desviación media de dos replicaciones con respecto al valor medio.

- Figura 18:** describe los resultados de la inducción de anticuerpos IgG1 específicos de PSCA. En particular, la Figura 18 muestra la presencia de anticuerpos IgG1 específicos para el antígeno tumoral PSCA en ratones que habían sido vacunados con la vacuna de ARNm consistente en 4 componentes, que contenían en cada caso ARNm optimizados por GC que codificaban los antígenos de diferenciación de próstata humana PSMA, STEAP, PSA y PSCA. Cada uno de ellos se formuló con el péptido catiónico protamina. Los ratones de control fueron tratados con tampón (Ringer-lactato). Para los análisis se reunieron y titularon sueros de 5 ratones de cada grupo. Las barras de error representan la desviación media de dos replicaciones con respecto al valor medio.
- Figura 19:** muestra la inducción de células T citotóxicas específicas de PSMA. Cinco ratones por grupo fueron vacunados bien con la vacuna de ARNm consistente en 4 componentes, que contenían en cada caso ARNm optimizados por GC que codificaban los antígenos de diferenciación de próstata humana PSMA, STEAP, PSA y PSCA, bien con ARNm irrelevante (Pp Luc) formulado con protamina de forma análoga a la vacuna de ARNm. El día 6 después de la última vacunación se aislaron esplenocitos de ratones vacunados y de control y se estimularon bien con genoteca de péptidos derivados de PSMA, bien con genoteca de péptidos de control. La secreción de IFN- γ se midió *ex vivo* utilizando la técnica ELISPOT. Las líneas representan el valor mediano y el intervalo de 5 ratones por grupo analizados por separado. El análisis estadístico se realizó con GraphPad Prism, el valor p se calculó con una prueba de Mann-Whitney unilateral.
- Figura 20:** muestra la inducción de células T citotóxicas específicas de PSMA *in vivo*. Unos ratones C57BL/6 fueron vacunados vía intradérmica en tres ciclos de vacunación con la vacuna de ARNm consistente en 4 componentes, que contenían en cada caso ARNm optimizados por GC que codificaban los antígenos de diferenciación de próstata humana PSMA, STEAP, PSA y PSCA. Los ratones de control fueron vacunados con ARNm de control Pp Luc o fueron tratados con tampón (Ringer-lactato). El día 6 después de la última inyección, 30×10^6 esplenocitos marcados de forma diferencial (población baja y alta, cargada con genoteca de péptidos derivados de PSMA o con genoteca de péptidos de control, mezclada en la proporción 1:1) fueron administrados por infusión intravenosa. Dieciséis horas después se aislaron esplenocitos de los ratones receptores y se analizaron mediante citometría de flujo. El gráfico muestra puntos de datos simples de ratones individuales. Las líneas representan el valor mediano y el intervalo de valores. Se analizaron 5 ratones por grupo. El análisis estadístico se realizó con GraphPad Prism, el valor p se calculó con una prueba de Mann-Whitney.
- Figura 21:** muestra la inducción de células T citotóxicas de memoria específicas de PSA diez semanas después de la última vacunación. Unos ratones C57BL/6 fueron vacunados en dos ciclos de vacunación con la vacuna de ARNm consistente en 4 componentes, que contenían en cada caso ARNm optimizados por GC que codificaban los antígenos de diferenciación de próstata humana PSMA, STEAP, PSA y PSCA. Los ratones de control fueron tratados con tampón (Ringer-lactato). Diez semanas después de la última inyección, 30×10^6 esplenocitos marcados de forma diferencial (población baja y alta, cargada con genoteca de péptidos derivados de PSA o con genoteca de péptidos de control, mezclada en la proporción 1:1) fueron trasplantados por vía intravenosa. Dieciséis horas después se aislaron esplenocitos de los ratones receptores y se analizaron mediante citometría de flujo. El gráfico muestra puntos de datos simples y las líneas representan valores medianos de 6 ratones por grupo analizados por separado. El análisis estadístico se realizó con GraphPad Prism, el valor p se calculó con una prueba de Mann-Whitney.
- Figura 22:** muestra la inducción de células T citotóxicas de memoria específicas de PSCA diez semanas después de la última vacunación. Unos ratones C57BL/6 fueron vacunados en dos ciclos de vacunación con la vacuna de ARNm consistente en 4 componentes, que contenían en cada caso ARNm optimizados por GC que codificaban los antígenos de diferenciación de próstata humana PSMA, STEAP, PSA y PSCA. Los ratones de control fueron tratados con tampón (Ringer-lactato). Diez semanas después de la última inyección, 30×10^6 esplenocitos marcados de forma

diferencial (población baja y alta, cargada con genoteca de péptidos derivados de PSCA o con genoteca de péptidos de control, mezclada en la proporción 1:1) fueron trasplantados por vía intravenosa. Dieciséis horas después se aislaron esplenocitos de los ratones receptores y se analizaron mediante citometría de flujo. El gráfico muestra puntos de datos simples y las líneas representan valores medianos de 6 ratones por grupo analizados por separado. El análisis estadístico se realizó con GraphPad Prism, el valor p se calculó con una prueba de Mann-Whitney.

Figura 23: muestra la inhibición del crecimiento tumoral en ratones vacunados con la vacuna de ARNm consistente en 4 componentes, que contenían en cada caso ARNm optimizados por GC que codificaban los antígenos de diferenciación de próstata humana PSMA, STEAP, PSA y PSCA. Unos ratones C57BL/6 fueron vacunados por vía intradérmica en dos ciclos de vacunación con la vacuna de ARNm. Los ratones de control fueron tratados con tampón. Quince días después de la última vacunación, los ratones fueron estimulados vía subcutánea con 1×10^6 células tumorales TRAMP-C1 singénicas. El crecimiento tumoral se monitorizó. El gráfico muestra el logaritmo del volumen tumoral medido el día 52 después de la estimulación tumoral. El análisis estadístico se realizó con GraphPad Prism, el valor p se calculó con una prueba de Mann-Whitney.

Ejemplos

Los siguientes ejemplos están concebidos para ilustrar adicionalmente la invención.

1. Preparación de plásmidos codificadores

En el siguiente experimento, secuencias de ADN correspondientes a las secuencias de ARNm respectivas terminan codificando los antígenos. Se prepararon

- PSA (antígeno prostático específico),
- PSMA (antígeno de membrana específico de próstata),
- PSCA (antígeno de células madre de próstata), y
- STEAP (antígeno epitelial de seis dominios transmembrana de la próstata),

respectivamente, y se utilizaron para experimentos de transcripción y transfección *in vitro*. De este modo, la secuencia de ADN correspondiente al antígeno nativo que codifica ARNm (secuencias que comprenden las secuencias codificadoras de acuerdo con las Figuras 2, 5, 8 y 11, es decir, las SEQ ID NO: 2, 5, 8 y 11) se optimizó por GC para un mejor uso de codones, obteniéndose una secuencia que comprendía las secuencias de codificación de acuerdo con las Figuras 3, 6, 9 y 12, es decir, las SEQ ID NO: 3, 6, 9 y 12. Después, las secuencias codificadoras se transfirieron a una construcción optimizada por GC (CureVac GmbH, Tübingen, Alemania), que había sido modificada con una marca poli-A y una marca poli-C (A70-C30). Los constructos finales se denominaron:

RNAActive CAP-KLK3(GC)-muag-A70-C30 (SEQ ID NO: 1),
 RNAActive CAP-FOLH1(GC)-muag-A70-C30 (SEQ ID NO: 4),
 RNAActive CAP-PSCA(GC)-muag-A70-C30 (SEQ ID NO: 7), y
 RNAActive CAP-STEAP(GC)-muag-A70-C30 (SEQ ID NO: 10),

respectivamente.

Los constructos finales comprenden una secuencia de acuerdo con las secuencias mostradas en las Figuras 1, 4, 7 y 10 (SEQ ID NO: 1, 4, 7 y 10), respectivamente, que contienen los siguientes elementos de secuencia: una secuencia optimizada por GC para estabilización y un mejor uso de codones
 ~ 70 x adenosina en el extremo 3'-terminal (cola poli-A),
 30 x citidina en el extremo 3'-terminal (cola poli-C).

2. Transcripción *in vitro*

Las secuencias de ARN se prepararon mediante transcripción *in vitro* sobre la base del ADN plásmido recombinante obtenido en el Ejemplo 1. Así, el ADN plásmido recombinante se linealizó y a continuación se transcribió *in vitro* utilizando la T7 ARN polimerasa. Después, el molde de ADN se degradó mediante digestión con ADNasa, y el ARN se recuperó mediante precipitación de LiCl y se purificó adicionalmente mediante extracción por HPLC (PUREMessage®, CureVac GmbH, Tübingen, Alemania).

3. Formación de complejos con protamina

Preferiblemente, para la transfección del ARN dentro de células y organismos, se formaron complejos con el ARN obtenido mediante transcripción *in vitro*, de forma especialmente preferible con protamina después de mezclar el ARN con protamina.

4. Experimentos de inmunización

Para la inmunización, el ARN obtenido mediante el experimento de transcripción *in vitro* arriba mostrado (véase el Experimento 2) se transfectó a ratones (ratones: C57 BL/6), preferiblemente en complejo con protamina. La vacunación se llevó a cabo en diferentes grupos, y a un grupo (grupo de control) se le inyectó tampón como control. Cuatro ratones por grupo fueron inmunizados vía intradérmica cuatro veces con 20 µg de ARNm (5 µg por gen) en complejo con protamina, y el ARN codificaba PSA, PSMA, PSCA y STEAP.

5. Detección de una respuesta inmunitaria específica de antígeno (respuesta inmunitaria de células B)

La detección de una respuesta inmunitaria específica de antígeno (respuesta inmunitaria de células B) se llevó a cabo detectando anticuerpos específicos de antígeno. Así, una semana después de la última vacunación se extrajeron muestras de sangre de los ratones vacunados y se prepararon sueros. Se revistieron placas MaxiSorb (Nalgene Nunc International) con proteína de PSA humana (0,5 µg/pocillo). Después de bloquearlas con 1 x PBS que contenía un 0,05% Tween-20 y un 1% de BSA, las placas se incubaron con suero de ratón diluido (1:30, 1:90, 1:270, 1:810). A continuación, se añadió un anticuerpo secundario acoplado con biotina (Anti-mouse-IgG2a Pharmingen). Después de lavarla, la placa se incubó con peroxidasa de rábano picante-estreptavidina y a continuación se midió la conversión del sustrato de ABTS (ácido 2,2'-azino-bis-3-etil-benzotiazolin-6-sulfónico). Como se puede ver en la Figura 13, la administración de una mezcla de ARN, es decir, de un cóctel de ARN-PCa que comprende ARNm que codifica PSA, PSMA, PSCA o STEAP, respectivamente, (secuencias mostradas en las Figuras 1, 4, 7 y 10 (SEQ ID NO: 1, 4, 7 y 10), respectivamente) mostró una inducción significativa de una respuesta inmunitaria específica de antígeno (respuesta inmunitaria de células B) debido a una formación significativa de anticuerpos IgG2a contra PSA en comparación con las muestras de ratones de control.

6. Detección de una respuesta inmunitaria celular específica de antígeno mediante ELISPOT

Dos meses después de la última vacunación, los ratones fueron sacrificados, se les extirparon los bazo y se aislaron los esplenocitos. Los esplenocitos se incubaron durante 7 días en presencia de células dendríticas seleccionadas por IL-4. Para determinar una respuesta inmunitaria celular específica de antígeno se midió la secreción de IFN-gamma después de la reestimulación. Como células diana se utilizaron esplenocitos de un ratón nativo, que se sometieron a electroporación con el cóctel de ARN-PCa (mezcla) o con ARNm que codifica PSA, PSMA, PSCA o STEAP (secuencias mostradas en las Figuras 1, 4, 7 y 10 (SEQ ID NO: 1, 4, 7 y 10), respectivamente).

Para la detección de IFN-gamma, una placa multipantalla (Millipore) se incubó a lo largo de la noche con tampón de revestimiento 0,1M, tampón de carbonato-bicarbonato, pH 9,6, 10,59 g/l Na₂CO₃, 8,4 g/l NaHCO₃, que comprendía anticuerpo contra IFN_γ (BD Pharmingen, Heidelberg, Alemania). En la placa se incubaron juntas células diana y células efectoras en una relación de 1:20 durante 24 horas. La placa se lavó con 1 x PBS y se incubó con un anticuerpo secundario acoplado con biotina. Después de lavar la placa con 1 x PBS/0,05% Tween-20, a la misma se le añadió el sustrato (sistema de sustrato líquido de fosfato de 5-bromo-4-cloro-3-

indolilo/tetrazolio azul nitro de Sigma Aldrich, Taufkirchen, Alemania) y la conversión del sustrato se pudo detectar visualmente.

Como se puede ver en la Figura 14, la vacunación de ratones con el cóctel de ARN-PCa que codifica PSA, PSMA, PSCA o STEAP (secuencias mostradas en las Figuras 1, 4, 7 y 10 (SEQ ID NO: 1, 4, 7 y 10), respectivamente) conduce a una inducción significativa de una respuesta inmunitaria específica de antígeno (CTL) contra los cuatro antígenos debido a una formación significativa de INF-gama en comparación con ratones nativos y ratones vacunados con tampón.

7. Estimulación tumoral

a) Inmunización:

- 10 A los ratones se les inyectaron vía intramuscular 20 µg de ARNm (cóctel de ARN-PCa de la invención que comprende 5 µg de ARNm que codifica PSA, PSMA, PSCA o STEAP, respectivamente, por ejemplo los constructos RNaive CAP-KLK3(GC)-muag-A70-C30, RNaive CAP-FOLH1(GC)-muag-A70-C30, RNaive CAP-PSCA(GC)-muag-A70-C30, y RNaive CAP-STEAP(GC)-muag-A70-C30, respectivamente (secuencias mostradas en las Figuras 1, 4, 7 y 10, es decir SEQ ID NO: 1, 4, 7 y 10). La inmunización se repitió 1 o 3 veces
- 15 en un plazo de 7 semanas. Cuarenta días después de la última inmunización, a los ratones se les inyectó vía subcutánea 1 millón de células tumorales Tramp-C1. El volumen tumoral se determinó en un plazo de 50 días.

b) Resultados

- Tal como se puede ver en la Figura 15, el volumen tumoral se reduce significativamente después de la inmunización con el cóctel de ARN-PCa de acuerdo con a) que comprende ARNm que codifica PSA, PSMA, PSCA y STEAP, respectivamente, 2x i.m. (intramuscular). El volumen tumoral se reduce todavía más cuando el cóctel de ARN-PCa de acuerdo con a) se administra 4x i.m. (intramuscular).
- 20

8. Preparación de una vacuna de ARNm e inducción de anticuerpos citotóxicos específicos de antígeno y células T citotóxicas específicas de antígenos

8.1 Preparación de una vacuna de ARNm

- 25 La vacuna de ARNm consiste en ARNm optimizados por GC que codifican los antígenos de diferenciación de próstata humana PSMA, STEAP, PSA y PSCA (de acuerdo con SEQ ID NO: 3, 6, 9 y 12), cada antígeno formulado con el péptido catiónico protamina en una relación en masa de 4:1 (ARN:protamina) disuelto en solución de Ringer-lactato al 80% (v/v).

8.2 Vacunación

- 30 Unos ratones C57BL/6 fueron vacunados vía intradérmica con 64 µg (16 µg por antígeno) de la vacuna de ARNm tal como se describe más arriba en 8.1. Los ratones de control fueron tratados con tampón (Ringer-lactato) o con ARN irrelevante (ARNm enriquecido por GC que codifica luciferasa de *Photinus pyralis*) formulado con protamina de forma análoga a la vacuna de ARNm. La vacunación incluía dos o tres ciclos de inmunización en las semanas 1, 3 (y 7). Cada ciclo consistía en 4 inyecciones los días 1, 2, 3 y 4 de la semana.

35 8.3 Estimulación tumoral

Quince días después de completar la vacunación se trasplantaron 1×10^6 células TRAMP-C1 (adenocarcinoma transgénico de la línea celular de próstata de ratón 1, que expresa homólogos de ratón correspondientes a PSMA, PSCA y STEAP humanos) por ratón. Los tumores eran palpables cuatro semanas después de la inoculación de las células tumorales. El crecimiento tumoral se controló midiendo el tamaño del tumor con calibre.

40 8.4 Detección de anticuerpos específicos de antígeno

Catorce días después de la última vacunación se extrajeron muestras de sangre (200 µl) vía retro-orbital y el suero se analizó en cuanto a la presencia de los subtipos IgG1 e IgG2a de anticuerpo específico de antígeno utilizando el siguiente protocolo ELISA. Unas placas ELISA de 96 pocillos se revistieron con proteína

recombinante PSCA o PSA purificado humano (en ambos casos: 10 µg/ml en el tampón de revestimiento) y (después de bloquearlas y lavarlas) se incubaron con suero durante 4 horas a 37°C. Después de incubación con anticuerpo marcado con biotina contra IgG1 o IgG2a de ratón e incubación subsiguiente con HRP-estreptavidina, se añadió el sustrato TMB. La reacción colorimétrica se midió a 450 nm utilizando un lector ELISAS Tecan.

5 8.5 ELISPOT - Detección de respuestas de CTL (célula T citotóxica)

Para la detección de respuestas de CTL (células T citotóxicas), los análisis de secreción de IFN-γ en respuesta a un estímulo específico se puede visualizar a nivel de una sola célula utilizando la técnica ELISPOT.

Seis días después de la última vacunación en el tercer ciclo de vacunación se aislaron esplenocitos de ratones vacunados con la vacuna de ARNm tal como se describe más arriba en 8.1 y de ratones de control, y después se transfirieron a placas ELISPOT de 96 pocillos revestidas con un anticuerpo de captura de α-IFN-γ. Después, las células se estimularon durante 24 horas a 37°C con una genoteca de péptidos derivados de PSMA o con una genoteca derivada de VIH como control. Las dos genotecas se utilizaron en una concentración de 1 µg/péptido/ml. Después del período de incubación, las células se retiraron de la placa por lavado y se detectó el IFN-γ segregado por las células utilizando un anticuerpo secundario biotinilado contra IFN-γ murina, seguido por estreptavidina-AKP. Las manchas se visualizaron utilizando sustrato BCIP/NBT y se contaron utilizando un lector ELISPOT automático (Immunospot Analyzer, CTL Analyzers LLC).

8.6 Citotoxicidad *in vivo*

Para detectar la actividad de células T citotóxicas *in vivo* se analizó la lisis de células diana específicas en los ratones vacunados y de control. El ensayo se llevó a cabo una semana y 10 semanas después de la última inmunización para detectar la inducción de linfocitos T citotóxicos de memoria.

Se aislaron esplenocitos de ratones donantes intactos y se marcaron con dos concentraciones diferentes del colorante fluorescente CFSE. De este modo se crearon dos poblaciones de intensidad de fluorescencia alta y baja. Las células con baja fluorescencia se cargaron durante 3 horas a 37°C con genotecas de péptidos restringidas derivadas de PSMA, PSA o PSCA (1 µg/ml/péptido). Las células de control con alta fluorescencia se cargaron con genoteca de péptidos derivada de VIH pol (1 µg/ml/péptido) correspondientemente. Las dos poblaciones se mezclaron en una proporción célula:célula de 1:1 y se trasplantaron vía intravenosa a ratones receptores intactos o vacunados. Dieciséis horas después se aislaron esplenocitos de ratones receptores y se analizaron en cuanto a la presencia de células fluorescentes mediante citometría de flujo. El cambio de la relación entre células de fluorescencia baja y alta en ratones vacunados representaba la destrucción específica de células diana *in vivo*. Se estimó la relación exacta entre el número de células diana específicas observadas y células de control observadas como el valor medio en todos los ratones de control. Esta relación posibilita una predicción de dianas específicas esperadas en ratones vacunados en base a las células de control observadas. La relación entre la cantidad observada y prevista de diana específica representa el porcentaje de dianas específicas restantes (no destruidas).

Se aplicaron las siguientes reglas:

Relación = dianas específicas (observadas) en ratones de control / dianas de control (observadas) en ratones de control

Relación x cantidad de dianas de control observadas en ratones vacunados = cantidad prevista de dianas específicas en ratones vacunados

% destrucción = (1-(dianas específicas observadas/dianas específicas previstas)

8.7 Análisis estadístico

El análisis estadístico se realizó utilizando el software GraphPad Prism, Versión 5.01. Debido a la falta de distribución normal de las poblaciones de muestra y el pequeño tamaño de la muestra, para analizar las diferencias entre los grupos de ensayo se utilizaron pruebas de Mann Whitney no paramétricas con un nivel de significancia de un 5%.

8.9 Resultados y discusión

Los ratones fueron vacunados con la vacuna de ARNm consistente en ARNm optimizado por GC que codifican los antígenos de diferenciación de próstata humana PSMA, STEAP, PSA y PSCA, cada uno formulado por separado con el péptido catiónico protamina en una relación en masa de 4:1 (ARN:protamina). Los ratones de control fueron tratados con tampón (Ringer-lactato) o con ARN irrelevante (Pp Luc) formulado con protamina de forma análoga a la vacuna de ARNm.

a) Inducción de anticuerpos específicos de antígeno en respuesta a la vacunación con la vacuna de ARNm

Con limitación por la disponibilidad de proteína recombinante necesaria para la detección de anticuerpos, se analizó la inducción de anticuerpos específicos para dos de los cuatro antígenos. Para las dos proteínas analizadas PSA y PSCA se detectaron anticuerpos específicos de antígeno en suero de ratones vacunados con la vacuna de ARNm, demostrando que los dos ARNm eran funcionales e inmunógenos *in vivo* (véanse las Figuras 16 a 18).

b) Inducción de células T citotóxicas específicas de antígenos en respuesta a la vacunación con la vacuna de ARNm

Además, la activación de células T citotóxicas en respuesta a la administración de la vacuna de ARNm se analizó aplicando dos ensayos funcionales independientes: secreción de IFN- γ y ensayo de citotoxicidad *in vivo*. El IFN- γ es el mediador principal de la respuesta de Th1 y es segregado por CTL activadas. Por tanto, la presencia de células T citotóxicas específicas de antígeno en esplenocitos de ratones vacunados se investigó utilizando la técnica ELISPOT. Como estímulo antigénico para esplenocitos se utilizó una genoteca de péptidos derivados de PSMA restringida. La estimulación con esta genoteca condujo a una alta secreción de IFN- γ , pero solo en esplenocitos de ratones vacunados con la vacuna de ARNm y no en ratones de control, vacunados con ARNm que codifica la proteína irrelevante luciferasa (Pp Luc). Ninguno de los esplenocitos reaccionó a la genoteca de péptidos de control derivados de VIH (Figura 19).

La inmunidad celular específica de antígeno frente a PSMA se pudo confirmar mediante un ensayo de citotoxicidad *in vivo*. En los cinco ratones vacunados con la vacuna de ARNm se observó una destrucción específica de células diana cargadas con una genoteca de péptidos derivada de PSMA restringida, sin embargo, el efecto citotóxico osciló entre un 12 y un 90%. Los ratones vacunados con ARN de control (Pp Luc) o solución de inyección (tampón Ringer-lactato) no pudieron eliminar células diana administradas por infusión (véase la Figura 20).

En otro experimento se investigó si la vacunación con la vacuna de ARNm induce efectos de memoria continuados *in vivo*. Para abordar esta cuestión, diez semanas después de completarse la vacunación se determinó la presencia de células T citotóxicas de memoria específicas de antígeno mediante un ensayo de citotoxicidad *in vivo*. La destrucción específica de células diana se observó después de la vacunación para PSA y para PSCA (Figuras 21-22). En conjunto, la vacuna de ARNm induce una inmunidad celular duradera (al menos 10 semanas) continuada en ratones.

Por último se ensayó la capacidad de la vacuna de ARNm para inducir respuestas antitumorales en ratones. Para abordar esta cuestión se utilizó la línea celular tumoral TRAMP-C1. TRAMP-C1 expresa los homólogos de ratón de los antígenos humanos PSMA, PSCA y STEAP incluidos en la vacuna de ARNm como ARNm codificadores de antígeno. La homología entre ratón y hombre varía entre un 50 y un 80% para los diferentes antígenos. Debido al hecho de que los ratones fueron vacunados con ARNm que codificaban proteínas humanas, una protección contra células tumorales TRAMP-C1 solo puede ser mediada por reactividad cruzada. Tal como se muestra en la Figura 23, la vacunación de ratones con la vacuna de ARNm medió en la protección contra el crecimiento de tumores TRAMP-C1 trasplantados. Esta observación indica la capacidad de la vacuna de ARNm para inducir reactividad cruzada en ratones.

LISTA DE SECUENCIAS

<110> Curevac GmbH

5 <120> Cóctel PCa

<130> CU01P067WO1

<150> PCT/EP2007/008771

10 <151> 09-10-2007

<160> 14

<170> PatentIn versión 3.3

15

<210> 1

<211> 990

<212> ADN

<213> Artificial

20

<220>

<223> Descripción de secuencia: constructo RNActivell KLK3(GC) = PSA (véase la Figura 1)

<400> 1

25

```

gggagaaaagc ttaccatgtg ggtgccggtc gtgttcctga ccctcagcgt gacgtggatc      60
ggcgccgcgc ccctgatcct gtcgcggatc gtgggggggt gggagtgcga gaagcacagc      120
cagccctggc aggtgctggt ggccagccgc ggccgggccc tgtgcggcgg cgtgctggtg      180
cacccccagt ggggtgctgac cgccgccac tgcattccga acaagagcgt catcctgctg      240
ggccggcaca gcctgttcca ccccaggagc accggccagg tgttccaggt gagccacagc      300
ttccccacc ccctgtacga catgagcctc ctgaagaacc ggttcctgcg gcccggcgac      360
gacagcagcc acgacctgat gctgctgcgg ctgagcgagc ccgccgagct gaccgacgcc      420
gtgaagggtga tggacctgcc gaccaggag cccgccctgg gcaccacctg ctacgccagc      480
ggctggggga gcatcgagcc cgaggagttc ctcaccccca agaagctgca gtgcgtggac      540
ctgcacgtga tcagcaacga cgtgtgcgcc caggtgcacc ccagaaggt gaccaagtcc      600
atgctgtgcg ccggccggtg gaccggcggc aagagcacct gcagcggcga cagcggcggc      660
cccctggtct gcaacggcgt gctgcagggc atcaccagct ggggcagcga gccctgcgcc      720
ctgcccgagc gcccagcct gtacaccaag gtggtgcact accggaagtg gatcaaggac      780
accatcgtgg ccaaccctg accactagtt ataagactga ctagcccgat gggcctccca      840
acggggccctc ctccctcct tgcaccgaga ttaataaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa      900
aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa attccccccc cccccccccc      960
ccccccccc ccctctagac aattggaatt      990

```

<210> 2
 <211> 786
 <212> ADN
 <213> Artificial

5

<220>
 <223> Descripción de secuencia: CDS KLK3(wt) = PSA (véase la Figura 2)

<400> 2

10

```

atgtgggtcc cggttgtctt cctcaccctg tccgtgacgt ggattggtgc tgcacccctc      60
atcctgtctc ggattgtggg aggctgggag tgcgagaagc attcccaacc ctggcagggtg      120
cttgtggcct ctcgtggcag ggcagtctgc ggcggtgttc tggcgcaccc ccagtgggtc      180
ctcacagctg cccactgcat caggaacaaa agcgtgatct tgctgggtcg gcacagcctg      240
tttcatcctg aagacacagg ccaggtatct caggtcagcc acagcttccc acaccgctc      300
tacgatatga gcctcctgaa gaatcgattc ctcaggccag gtgatgactc cagccacgac      360
ctcatgctgc tccgcctgtc agagcctgcc gagctcacgg atgctgtgaa ggtcatggac      420
ctgcccaccc aggagccagc actggggacc acctgctacg cctcaggctg gggcagcatt      480
gaaccagagg agttcttgac cccaaagaaa cttcagtgtg tggacctcca tgttatttcc      540
aatgacgtgt gtgcgcaagt tcaccctcag aaggtagacca agttcatgct gtgtgctgga      600
cgctggacag ggggcaaaag cacctgctcg ggtgattctg ggggccact tgtctgtaat      660
ggtgtgcttc aaggatcac gtcattggggc agtgaaccat gtgccctgcc cgaaaggcct      720
tccctgtaca ccaagggtgt gcattaccgg aagtggatca aggacaccat cgtggccaac      780
ccctga                                         786
    
```

<210> 3
 <211> 786
 <212> ADN
 <213> Artificial

15

30
 <220>
 <223> Descripción de secuencia: constructo CDS KLK3(GC) = PSA (véase la Figura 3)

20

<400> 3

atgtgggtgc ccgtcgtgtt cctgaccctc agcgtgacct ggatcggcgc cgccccgctg	60
atcctgtccc ggatcgtcgg gggctgggag tgcgagaagc acagccagcc ctggcaggtg	120
ctcgtggcgt cccgcgggcg ggccgtctgc ggcgggggtgc tgggtgcaccc ccagtgggtc	180
ctgacggccg cccactgcat ccgcaacaag agcgtgatcc tcctgggccc gcactccctg	240
ttccaccccc aggacaccgg ccaggtgttc caggtcagcc actccttccc gcacccccctc	300
tacgacatga gcctgctgaa gaaccgcttc ctccggcccc gggacgactc cagccacgac	360
ctgatgctgc tccgcctgtc cgagccccgc gagctgaccg acgcggtgaa ggtgatggac	420
ctcccgaccc aggagccccg cctgggcacg acctgctacg ccagcgggtg gggctccatc	480
gagcccgagg agttcctgac cccaagaag ctccagtgcg tcgacctgca cgtgatcagc	540
aacgacgtgt gcgcccaggt ccacccgcag aaggtgacca agttcatgct gtgcgcgggg	600
cggtggacgg gcggcaagtc cacctgcagc ggggactccg gcgggcccct cgtgtgcaac	660
ggcgtcctgc agggcatcac cagctggggg tccgagccct gcgccctgcc cgagcgcccc	720
agcctctaca ccaaggtggt gcactaccgg aagtggatca aggacacgat cgtcgccaac	780
ccctga	786

- 5 <210> 4
 <211> 2457
 <212> ADN
 <213> Artificial

- 10 <220>
 <223> Descripción de secuencia: RNActiveII FOLH1(GC) = PSMA (véase la Figura 4)
 <400> 4

ES 2 633 246 T3

gggagaaaagc	ttaccatgtg	gaacctgctc	cacgagaccg	acagcgccgt	ggcgacggcc	60
cggcgcccgc	ggtggctgtg	cgccggcgcc	ctggctcctg	ccgggggctt	cttcctgctg	120
ggcttcctgt	tcggctggtt	catcaagtcg	agcaacgagg	ccaccaacat	cacccccaa	180
cacaacatga	aggccttcct	cgacgagctg	aaggccgaga	acatcaagaa	gttcctgtac	240
aacttcaccc	agatccccca	cctggccggg	accgagcaga	acttcagct	ggccaagcag	300
atccagagcc	agtggaagga	gttcggcctg	gactcggtgg	agctggcgca	ctacgacgtg	360
ctgctcagct	acccaacaa	gacccacccc	aactacatca	gcatcatcaa	cgaggacggc	420
aacgagatct	tcaacaccag	cctgttcgag	ccccgcccc	ccggctacga	gaacgtgtcg	480
gacatcgctg	cccccttcag	cgccttcagc	ccgcagggca	tgcccgaggg	ggacctggtg	540
tacgtgaact	acgcccggac	ggaggacttc	ttcaagctgg	agcgcgacat	gaagatcaac	600
tgcagcggca	agatcgatgat	cgccccgtac	ggcaaggtgt	tccggggcaa	caaggtgaag	660
aacgcccagc	tggccggggc	caagggcgctg	atcctgtact	cggacccccg	cgactacttc	720
gccccggcg	tgaagagcta	ccccgacggc	tggaacctgc	ccggcggggg	cgtccagcgc	780
ggcaacatcc	tcaacctgaa	cggcgccggc	gacccgctga	ccccgggta	ccccgcgaac	840
gagtacgcct	accggcgggg	catcgccgag	gccgtgggcc	tgcccgagcat	ccccgtgcac	900
ccgatcggct	actacgacgc	ccagaagctg	ctggagaaga	tgggcgggag	cgccccgccc	960
gactcgagct	ggcggggcag	cctgaaggtg	ccctacaacg	tgggcccccg	cttcaccggg	1020
aacttctcga	cccagaaggt	gaagatgcac	atccacagca	ccaacgaggt	gacccgcac	1080
tacaacgtga	tcggcaccct	gcggggcgcc	gtggagccc	accggtacgt	gatcctcggc	1140
gggcaccgcg	acagctgggt	gttcggcggc	atcgaccccc	agagcggcgc	cgccgtggtc	1200
cacgagatcg	tgcggtcgtt	cggcacctg	aagaaggagg	ggtggcgggc	ccgccggacg	1260
atcctgttcg	ccagctggga	cgcggaggag	ttcggcctgc	tgggcagcac	cgagtgggcc	1320
gaggagaaca	gccggctgct	gcaggagcgg	ggcgtggcct	acatcaacgc	cgactcgagc	1380
atcgagggca	actacaccct	ccgcgtggac	tgcacccccg	tgatgtacag	cctggtgcac	1440
aacctgacca	aggagctgaa	gagccccgac	gaggggttcg	agggaagtc	gctgtacgag	1500
agctggacca	agaagagccc	ctcgccccgag	ttcagcggca	tgccccggat	cagcaagctg	1560
ggcagcggga	acgacttcga	ggtgttcctc	cagcggctgg	gcatcgctc	gggccgcgcc	1620
cggtacacca	agaactggga	gacgaacaag	ttcagcggct	accccctcta	ccacagcgtg	1680

```
tacgagacct acgagctggt ggagaagttc tacgacccca tgttcaagta ccacctgacc 1740
gtggcccagg tgcggggcg gatggtgttc gagctggcca acagcatcgt gctgcccttc 1800
gactgccgag actacgccgt cgtgctgagg aagtacgccg acaagatcta ctcgatcagc 1860
atgaagcacc cccaggagat gaagacctac agcgtgagct tcgactcgct gttcagcgcg 1920
gtgaagaact tcaccgagat cgccagcaag ttctcggagc ggctccagga cttcgacaag 1980
agcaacccga tcgtgctgag catgatgaac gaccagctga tgttcctgga gcgggccttc 2040
atcgaccccc tgggcctgac cgaccggccc ttctaccggc acgtgatcta cgtccccagc 2100
agccacaaca agtacgccg cgagtcgttc ccggggatct acgacgccct gttcgacatc 2160
gagagcaagg tggaccccag caaggcctgg ggcgaggtga agcgccagat ctacgtggcc 2220
gccttcaccg tgcaggccgc ggccgagacc ctgagcgagg tggcctgacc actagttata 2280
agactgacta gcccgatggg cctcccaacg ggccctcctc ccctccttgc accgagatta 2340
ataaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa 2400
aaaaaatatt cccccccccc cccccccccc cccccccccc tctagacaat tggaatt 2457
```

<210> 5

<211> 2253

5 <212> ADN

<213> Artificial

<220>

<223> Descripción de secuencia: CDS FOLH1(wt) = PSMA (véase la Figura 5)

10

<400> 5

atgtggaatc	tccttcacga	aaccgactcg	gctgtggcca	ccgcgcgccg	cccgcgctgg	60
ctgtgcgctg	gggcgctggt	gctggcgggg	ggcttctttc	tcctcggtt	cctcttcggg	120
tggtttataa	aatcctccaa	tgaagctact	aacattactc	caaagcataa	tatgaaagca	180
tttttgatg	aattgaaagc	tgagaacatc	aagaagttct	tatataat	tacacagata	240
ccacatttag	caggaacaga	acaaaacttt	cagcttgcaa	agcaaattca	atcccagtg	300
aaagaatttg	gcctggattc	tgttgagcta	gcacattatg	atgtcctgtt	gtcctaccca	360
aataagactc	atcccaacta	catctcaata	attaatgaag	atggaaatga	gattttcaac	420
acatcattat	ttgaaccacc	tcctccagga	tatgaaaatg	tttcggatat	tgtaccacct	480
ttcagtgc	tctctcctca	aggaatgcca	gagggcgatc	tagtgtatgt	taactatgca	540
cgaactgaag	acttctttaa	attggaacgg	gacatgaaaa	tcaattgctc	tgggaaaatt	600
gtaattgcca	gatatgggaa	agttttcaga	ggaaataagg	ttaaaaatgc	ccagctggca	660
ggggccaaag	gagtcattct	ctactccgac	cctgctgact	actttgctcc	tggggtgaag	720
tcctatccag	atgggttgaa	tcttcctgga	ggtggtgtcc	agcgtggaaa	tatcctaaat	780
ctgaatggtg	caggagaccc	tctcacacca	ggttaccag	caaatgaata	tgcttatagg	840
cgtggaattg	cagaggctgt	tggctctcca	agtattcctg	ttcatccaat	tggatactat	900
gatgcacaga	agctcctaga	aaaaatgggt	ggctcagcac	caccagatag	cagctggaga	960
ggaagtctca	aagtgcccta	caatgttgga	cctggcttta	ctggaaactt	ttctacacaa	1020
aaagtcaaga	tgcacatcca	ctctaccaat	gaagtgacaa	gaatttacia	tgtgataggt	1080
actctcagag	gagcagtgga	accagacaga	tatgtcattc	tgggaggtca	ccgggactca	1140
tgggtgtttg	gtggtattga	ccctcagagt	ggagcagctg	ttgttcatga	aattgtgagg	1200
agctttggaa	cactgaaaaa	ggaaggggtg	agacctagaa	gaacaatttt	gtttgcaagc	1260
tgggatgcag	aagaatttgg	tcttcttggt	tctactgagt	gggcagagga	gaattcaaga	1320
ctccttcaag	agcgtggcgt	ggcttatatt	aatgctgact	catctataga	aggaaactac	1380
actctgagag	ttgattgtac	accgctgatg	tacagcttgg	tacacaacct	aacaaaagag	1440
ctgaaaagcc	ctgatgaagg	ctttgaaggc	aaatctcttt	atgaaagttg	gactaaaaaa	1500
agtccttccc	cagagttcag	tggcatgccc	aggataagca	aattgggatc	tggaaatgat	1560
tttgagggtg	tcttccaacg	acttgaatt	gcttcaggca	gagcacggta	tactaaaaat	1620
tgggaaacaa	acaaattcag	cggctatcca	ctgtatcaca	gtgtctatga	aacatatgag	1680
ttggtggaaa	agttttatga	tccaatgttt	aaatatcacc	tactgtggc	ccaggttcga	1740
ggagggatgg	tgtttgagct	agccaattcc	atagtgtccc	cttttgattg	tcgagattat	1800
gctgtagttt	taagaaagta	tgctgacaaa	atctacagta	tttctatgaa	acatccacag	1860
gaaatgaaga	catacagtgt	atcatttgat	tcactttttt	ctgcagtaaa	gaattttaca	1920
gaaattgctt	ccaagttcag	tgagagactc	caggactttg	acaaaagcaa	cccaatagta	1980
ttaagaatga	tgaatgatca	actcatgttt	ctggaaagag	catttattga	tccattaggg	2040

ttaccagaca ggccttttta taggcatgtc atctatgctc caagcagcca caacaagtat 2100
gcaggggagt cattcccagg aatttatgat gctctgtttg atattgaaag caaagtggac 2160
ccttccaagg cctggggaga agtgaagaga cagatttatg ttgcagcctt cacagtgcag 2220
gcagctgcag agactttgag tgaagtagcc taa 2253

<210> 6

<211> 2253

5 <212> ADN

<213> Artificial

<220>

<223> Descripción de secuencia: CDS FOLH1(GC) = PSMA (véase la Figura 6)

10

<400> 6

atgtggaacc tgctccacga gaccgacagc gccgtggcca ccgcgcggcg cccccggtgg 60
ctgtgcgccg gcgccctggt cctcgccggg ggcttcttcc tgctgggggt cctcttcggc 120
tggttcatca agtccagcaa cgaggccacg aacatcaccc cgaagcacia catgaaggcg 180
ttcctggacg agctgaaggc cgagaacatc aagaagttcc tctacaactt caccagatc 240
ccccacctgg ccgggaccga gcagaacttc cagctggcca agcagatcca gtcccagtgg 300
aaggagttcg gcctcgacag cgtggagctg gcgcactacg acgtgctgct ctctacccc 360

ES 2 633 246 T3

```

aacaagacgc accccaacta catcagcatc atcaacgagg acggcaacga gatcttcaac 420
acctccctgt tcgagccgcc cccccccggg tacgagaacg tcagcgacat cgtgccgccc 480
ttctccgcct tcagccccc a gggcatgccc gagggggacc tgggtgtacgt caactacgcc 540
cgcaccgagg acttcttcaa gctcgagcgg gacatgaaga tcaactgctc cggcaagatc 600
gtgatcgcgc gctacgggaa ggtgttccgg ggcaacaagg tcaagaacgc ccagctggcg 660
ggcgccaagg ggggtgatcct gtacagcgac ccggccgact acttcgcccc cggcgtgaag 720
tcctaccccg acgggtggaa cctccccggc ggcggggtcc agcgcggcaa catcctgaac 780
ctgaacgggg ccggcgaccc gctcaccccc gggtagcccc cgaacgagta cgcctaccgg 840
cgcggcatcg ccgaggccgt gggcctgccc agcatcccgg tgcaccccat cgggtactac 900
gacgcccaga agctgctcga gaagatgggc ggggtccgcgc ccccgacag ctcttgccgg 960
ggcagcctga aggtcccgt a caacgtgggg cccggcttca cgggcaactt ctccaccag 1020
aagggtgaaga tgcacatcca cagcaccaac gaggtcacc gcactataaa cgtgatcggg 1080
acgctgcggg gcgccgtgga gcccgaccgc tacgtcatcc tcggggggcca ccgggacagc 1140
tgggtgttcg ggggcatcga cccccagtcc ggcgccgccc tgggtccacga gatcgtgcgc 1200
agcttcggga ccctgaagaa ggagggctgg cggccgcgcc ggaccatcct gttcgcctcc 1260
tgggacgcgg aggagtccg gctcctgggc agcaccgagt gggccgagga gaactccgc 1320
ctgctccagg agcggggcgt cgcctacatc aacgccgaca gctccatcga ggggaactac 1380
acgctgcgcg tggactgcac cccgctgatg tacagcctcg tgcacaacct gaccaaggag 1440
ctgaagtccc ccgacgaggg cttcgagggg aagagcctct acgagtcctg gaccaagaag 1500
agcccgtccc ccgagttcag cggcatgccc cggatctcca agctggggag cggcaacgac 1560
ttcgaggctt tcttccagcg gctgggcatc gcgtccgggc gcgcccggta cacgaagaac 1620
tgggagacca acaagttcag cggctacccc ctctaccact ccgtgtacga gacctacgag 1680
ctggtggaga agttctacga cccgatgttc aagtaccacc tgaccgtcgc ccaggtgcgc 1740
gggggcatgg tggtcgagct ggccaacagc atcgtcctcc ctttcgactg ccgggactac 1800
gccgtggtgc tgcgcaagta cgcggacaag atctacagca tctccatgaa gcacccccag 1860
gagatgaaga cgtacagcgt ctccttcgac agcctgttct ccgccgtgaa gaacttcacc 1920
gagatcgcca gcaagtctc cgagcggctc caggacttcg acaagagcaa ccccatcgtg 1980
ctgcgcatga tgaacgacca gctgatgttc ctcgagcggg ctttcatcga cccgctgggg 2040
ctgcccgacc gccccttcta ccggcacgtc atctacgccc cctccagcca caacaagtac 2100
gcgggcgagt ccttcccggg gatctacgac gccctcttcg acatcgagag caagggtggac 2160
ccctccaagg cctggggcga ggtgaagcgc cagatctacg tcgccgcctt caccgtgcag 2220
gcggccgccc agaccctgag cgaggtggcc tga 2253

```

<210> 7

<211> 576

5 <212> ADN

<213> Artificial

<220>

<223> Descripción de secuencia: RNActiveII PSCA(GC) (véase la Figura 7)

5

<400> 7

```

gggagaaagc ttaccatgaa ggccgtgctg ctcgctgctg tgatggccgg cctggccctg      60
cagccgggga ccgccctgct gtgctacagc tgcaaggccc aggtctcgaa cgaggactgc      120
ctgcagggtgg agaactgcac gcagctgggc gagcagtgtg ggaccgcccg gatccgcgcc      180
gtgggacctg tcaccgtgat cagcaagggc tgcagcctga actgcgtgga cgacagccag      240
gactactacg tgggcaagaa gaacatcacc tgctgcgaca ccgacctgtg caacgccagc      300
ggcgcccacg ccctgcagcc cgcggccgcc atcctggccc tgctgcccgc cctgggcctg      360
ctgctctggg gccccggcca gctgtgacca ctagttataa gactgactag cccgatgggc      420
ctccaacgg gccctcctcc cctccttgca ccgagattaa taaaaaaaaa aaaaaaaaaa      480
aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaatattc ccccccccc      540
cccccccccc cccccccct ctagacaatt ggaatt                                576

```

<210> 8

10 <211> 372

<212> ADN

<213> Artificial

<220>

15 <223> Descripción de secuencia: CDS PSCA(wt) (véase la Figura 8)

<400> 8

```

atgaaggctg tgctgcttgc cctgttgatg gcaggcttgg ccctgcagcc aggcactgcc      60
ctgctgtgct actcctgcaa agcccagggtg agcaacgagg actgcctgca ggtggagaac      120
tgcaccagc tgggggagca gtgctggacc gcgcgcatcc gcgcagttgg cctcctgacc      180
gtcatcagca aaggctgcag cttgaactgc gtggatgact cacaggacta ctacgtgggc      240
aagaagaaca tcacgtgctg tgacaccgac ttgtgcaacg ccagcggggc ccatgccctg      300
cagccggctg ctgccatcct tgcgctgctc cctgcactcg gcctgctgct ctggggaccc      360
ggccagctct ag                                                         372

```

20 <210> 9

<211> 372

<212> ADN

<213> Artificial

25 <220>

<223> Descripción de secuencia: CDS PSCA(GC) (véase la Figura 9)

<400> 9

ES 2 633 246 T3

```

atgaaggccg tgctgctcgc cctgctgatg gcgggcctcg ccctgcagcc cgggaccgcc      60
ctgctctgct acagctgcaa ggcccaggtc tccaacgagg actgcctgca ggtggagaac      120
tgcaccagc tgggcgagca gtgctggacg gcccggatcc gcgcggtggg gctcctgacc      180

gtcatcagca agggctgctc cctgaactgc gtggacgaca gccaggacta ctacgtgggg      240
aagaagaaca tcacctgctg cgacaccgac ctctgcaacg cctccggcgc ccacgccctg      300
cagccggcgg ccgcatcct ggccctcctg cccgccctgg gcctcctgct gtggggggccc      360
ggccagctct ga                                                              372

```

- 5 <210> 10
- <211> 1224
- <212> ADN
- <213> Artificial

- 10 <220>
- <223> Descripción de secuencia: RActive II STEAP (GC) = STEAP1 (véase la Figura 10)

```

<400> 10
gggagaaagc ttaccatgga gagccggaag gacatcacca accaggagga gctgtggaag      60
atgaagccgc gccggaacct cgaggaggac gactacctgc acaaggacac gggcgagacc      120
tcgatgctga agcggcccgt gctcctgcac ctgcaccaga ccgcccacgc ggacgagttc      180
gactgcccga gcgagctcca gcacacgcag gagctgttcc cgcagtggca cctgcccata      240
aagatcgccg ccatcatcgc gagcctcacc ttctgtaca ccctgctccg cgagggtcatc      300
caccgcgtgg ccacgtcgca ccagcagtac ttctacaaga tcccgatcct ggtgatcaac      360
aagggtgctc ccatggtcag catcaccctg ctggccctcg tgtacctgcc ggggggtgatc      420
gcggccatcg tccagctgca caacggcacc aagtacaaga agttcccgca ctggctcgac      480
aagtggatgc tgacgcggaa gcagttcggc ctgctcagct tcttcttcgc cgtgctgcac      540

```

15


```

aagtggatgc tgacgcggaa gcagttcggc ctgctcagct tcttcttcgc cgtgctgcac 540
gcgatctact cgctgagcta ccccatgcgg cgcagctacc ggtacaagct cctgaactgg 600
gcctaccagc aggtgcagca gaacaaggag gacgcctgga tcgagcacga cgtctggcgg 660
atggagatct acgtgtcgct ggggatcgtg ggcctcgca tcctggccct gctcgccgtc 720
accagcatcc cgagcgtgtc ggacagcctg acctggcgcg agttccacta catccagagc 780
aagctgggca tcgtgtcgct cctgctgggg acgatccacg cgctcatctt cgcttggaaac 840
aagtggatcg acatcaagca gttcgtcttg tacaccccg cccaccttcat gatcgccgtg 900
ttcctgccga tcgtggtcct gatcttcaag agcatcctct tcctgccgtg cctgcggaag 960
aagatcctca agatccggca cggctgggag gacgtgacga agatcaacaa gaccgagatc 1020
tgcagccagc tgtgaccact agttataaga ctgactagcc cgatgggcct cccaacgggc 1080
cctcctcccc tccttgacc gagattaata aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa 1140
aaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaatattccc ccccccccc ccccccccc 1200
ccccccctct agacaattgg aatt 1224

```

<210> 11

<211> 1020

5 <212> ADN

<213> Artificial

<220>

<223> Descripción de secuencia: CDS STEAP(wt) = STEAP1 (véase la Figura 11)

10

<400> 11

```

atggaaagca gaaaagacat cacaaccaa gaagaacttt ggaaaatgaa gcctaggaga 60
aatttagaag aagacgatta ttgcataag gacacgggag agaccagcat gctaaaaaga 120
cctgtgcttt tgcatttgca ccaaacagcc catgctgatg aatttgactg cccttcagaa 180

```

```

cttcagcaca cacaggaact ctttccacag tggcacttgc caattaaaat agctgctatt 240
atagcatctc tgacttttct ttacactctt ctgaggggaag taattcaccc tttagcaact 300
tcccatcaac aatattttta taaaattcca atcctggtca tcaacaaagt cttgccaatg 360
gtttccatca ctctcttggc attggtttac ctgccagggtg tgatagcagc aattgtccaa 420
cttcataatg gaaccaagta taagaagttt ccacattggt tggataagtg gatgttaaca 480
agaaagcagt ttgggcttct cagtttcttt tttgctgtac tgcattgcaat ttatagtctg 540
tcttacccaa tgaggcgatc ctacagatac aagttgctaa actgggcata tcaacagggtc 600
caacaaaata aagaagatgc ctggattgag catgatgttt ggagaatgga gatttatgtg 660
tctctgggaa ttgtgggatt ggcaatactg gctctgttgg ctgtgacatc tattccatct 720
gtgagtgact ctttgacatg gagagaattt cactatattc agagcaagct aggaattgtt 780
tcccttctac tgggcacaa acacgcattg atttttgcct ggaataagtg gatagatata 840
aaacaatttg tatggtatac acctccaact tttatgatag ctgttttcct tccaattgtt 900
gtcctgatat ttaaaagcat actattcctg ccatgcttga ggaagaagat actgaagatt 960
agacatgggt gggaagacgt caccaaaatt aacaaaactg agatatgttc ccagttgtag 1020

```

<210> 12
 <211> 1020
 5 <212> ADN
 <213> Artificial

<220>
 <223> Descripción de secuencia: CDS STEAP(GC) = STEAP1 (véase la Figura 12)

10

```

<400> 12
atggagagcc ggaaggacat caccaaccag gaggagctgt ggaagatgaa gccccgccgg 60
aacctcgagg aggacgacta cctgcacaag gacaccggcg agacgtccat gctgaagcgc 120
ccggtgctcc tgcacctgca ccagaccgcc cagcccgacg agttcgactg cccagcgag 180
ctccagcaca cccaggagct gttccccccag tggcacctgc ccatcaagat cgcggccatc 240
atcgcctccc tcaccttctt gtacacgctg ctccgggagg tcatccaccc gctggccacc 300
agccaccagc agtacttcta caagatcccc atcctggtga tcaacaaggt gctccccatg 360
gtctccatca ccctgctggc cctcgtgtac ctgccccggg tgatcgcggc catcgctccag 420
ctgcacaacg gcaccaagta caagaagttc ccgcactggc tcgacaagtg gatgctgacg 480
cgcaagcagt tcgggctgct cagcttcttc ttcgccgtgc tgcacgcat ctactccctg 540

```

agctacccca tgcggcgctc ctaccggtac aagctcctga actgggcgta ccagcaggtg 600
cagcagaaca aggaggacgc ctggatcgag cagcagctct ggcgcatgga gatctacgtg 660
agcctgggca tcgtggggct cgccatcctg gccctgctcg ccgtcacctc catccccagc 720
gtgtccgaca gcctgacctg gcgggagttc cactacatcc agtccaagct gggcatcgtg 780
agcctcctgc tgggcaccat ccacgcgctc atcttcgcct ggaacaagtg gatcgacatc 840
aagcagttcg tctggtacac gccccgacc ttcatgatcg ccgtgttcct gcccatcgtg 900
gtcctgatct tcaagtccat cctcttcctg ccctgcctgc gcaagaagat cctcaagatc 960
cggcacgggt gggaggacgt gaccaagatc aacaagaccg agatctgcag ccagctgtga 1020

<210> 13

<211> 13

5 <212> ARN

<213> Artificial

<220>

<223> descripción de secuencia: secuencia Kozak (véase la descripción p. 28)

10

<400> 13

gccgccacca ugg 13

<210> 14

15 <211> 15

<212> ARN

<213> Artificial

<220>

20 <223> descripción de secuencia: secuencia estabilizadora genérica (véase la descripción p. 30)

<220>

<221> variación

<222> (1) .. (1)

25 <223> /sustituir = "citosina"

/sustituir = "uracilo"

<220>

<221> misc_feature

30 <222> (1)..(1)

<223> n es a, c, g, o u

<220>

<221> variación

35 <222> (5)..(5)

<223> / sustituir = "citosina"

/sustituir = "uracilo"

/sustituir = "guanosina"

/sustituir = "adenosina", u otro ácido nucleico

40

<220>
 <221> repeat_unit
 <222> (5)..(5)
 <223> x = cualquier número
 5
 <220>
 <221> variación
 <222> (9)..(9)
 <223> /sustituir = "uracilo"
 10 /sustituir = "adenosina"

 <220>
 <221> repeat_unit
 <222> (10)..(10)
 15 <223> x = cualquier número

 <220>
 <221> variación
 <222> (10)..(10)
 20 <223> /sustituir = "pirimidina"

 <220>
 <221> variación
 <222> (13)..(13)
 25 <223> /sustituir = "citosina"
 /sustituir = "uracilo"

 <400> 14
 nccancccn ucnc 15
 30

Reivindicaciones

1. Composición inmunoestimuladora activa que comprende cuatro ARN, que codifican cada uno un antígeno diferente seleccionado entre:
5
 - STEAP (antígeno epitelial de seis dominios transmembrana de la próstata),
 - PSA (antígeno prostático específico),
 - PSMA (antígeno de membrana específico de próstata),
 - PSCA (antígeno de células madre de próstata).
102. Composición inmunoestimuladora activa según la reivindicación 1, en donde al menos un ARN comprende una longitud de 250 a 20.000 nucleótidos.
153. Composición inmunoestimuladora activa según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 2, en donde al menos un ARN es ARNm.
4. Composición inmunoestimuladora activa según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en donde
 - a) al menos un ARN es un ARN monocistrónico, bicistrónico o incluso multicistrónico;
 - 20b) al menos dos antígenos son codificados en cada caso por un ARN monocistrónico;
 - c) al menos dos antígenos son codificados por un ARN bicistrónico o multicistrónico; o
 - d) al menos dos antígenos son codificados por una mezcla de ARN monocistrónicos, bicistrónicos o incluso multicistrónicos.
255. Composición inmunoestimuladora activa según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en donde dichos cuatro ARN son monocistrónicos.
6. Composición inmunoestimuladora activa según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, en donde al menos un ARN comprende un ARN seleccionado entre ARN idénticos o al menos idénticos en un 70%
30a las secuencias de ARN de las SEQ ID N°: 2, 5, 8 u 11.
7. Composición inmunoestimuladora activa según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, en donde al menos un ARN es un ARN modificado, en particular un ARNm estabilizado.
358. Composición inmunoestimuladora activa según la reivindicación 7, en donde el contenido de G/C de la región codificadora del al menos un ARN está aumentado en comparación con el contenido de G/C de la región codificadora del ARN de tipo silvestre, preferiblemente no estando modificada la secuencia de aminoácidos codificadora del al menos un ARN en comparación con la secuencia de aminoácidos codificada del ARN de tipo silvestre.

9. Composición inmunoestimuladora activa según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, en donde al menos un ARN comprende un ARN seleccionado entre ARN idénticos o al menos idénticos en un 70% a las secuencias de ARN de las SEQ ID N°: 1, 3, 4, 6, 7, 9, 10 o 12.
- 5
10. Composición inmunoestimuladora activa según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9, en donde la composición comprende
- un ARN codificador de PSA que comprende una secuencia idéntica o al menos idéntica en un 70% a las SEQ ID N°: 1, 2 o preferiblemente 3,
- 10 un ARN codificador de PSMA que comprende una secuencia idéntica o al menos idéntica en un 70% a las SEQ ID N°: 4, 5 o preferiblemente 6,
- un ARN codificador de PSCA que comprende una secuencia idéntica o al menos idéntica en un 70% a las SEQ ID N°: 7, 8 o preferiblemente 9,
- y
- 15 un ARN codificador de STEAP que comprende una secuencia idéntica o al menos idéntica en un 70% a las SEQ ID N°: 10, 11 o preferiblemente 12.
11. Composición inmunoestimuladora activa según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9, en donde la composición comprende
- 20 un ARN codificador de PSA que comprende una secuencia idéntica o al menos idéntica en un 70% a las SEQ ID N°: 2 o preferiblemente 3,
- un ARN codificador de PSMA que comprende una secuencia idéntica o al menos idéntica en un 70% a las SEQ ID N°: 5 o preferiblemente 6,
- un ARN codificador de PSCA que comprende una secuencia idéntica o al menos idéntica en un 70% a las SEQ ID N°: 8 o preferiblemente 9,
- 25 y
- un ARN codificador de STEAP que comprende una secuencia idéntica o al menos idéntica en un 70% a las SEQ ID N°: 11 o preferiblemente 12.
- 30 12. Composición inmunoestimuladora activa según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 11, en donde al menos un ARN está en complejo con uno o más policationes, preferiblemente con protamina u oligofectamina, de forma totalmente preferible con protamina.
- 35 13. Composición inmunoestimuladora activa según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 12, en donde la composición activa comprende adicionalmente al menos un adyuvante, en donde el adyuvante se selecciona preferiblemente entre el grupo consistente en:
- 40 compuestos catiónicos o policationicos que comprenden péptidos o proteínas catiónicos o policationicos, incluyendo protamina, nucleolina, espermina o espermidina, poli-L-lisina (PLL), poli-arginina, polipéptidos básicos, péptidos penetrantes de células (CPP), incluyendo péptidos de unión de VIH, Tat, VIH-1 Tat (VIH), péptidos derivados de Tat, penetratina, péptidos

derivados de VP22 o análogos, HSV VP22 (herpes simplex), MAP, KALA o dominios de transducción de proteínas (PTD), PpT620, péptidos ricos en prolina, péptidos ricos en arginina, péptidos ricos en lisina, péptido(s) de MPG, Pep-1, L-oligómeros, péptido(s) de calcitonina, péptidos derivados de Antennapedia (en particular de *Drosophila antennapedia*), pAntp, plsl, FGF, lactoferrina, transportano, buforina-2, Bac715-24, SynB, SynB(1), pVEC, péptidos derivados de hCT, SAP, protamina, espermina, espermidina o histonas, polisacáridos catiónicos, incluyendo quitosán, polibreno, polímeros catiónicos, por ejemplo polietilenoimina (PEI), lípidos catiónicos, incluyendo DOTMA: cloruro de [1-(2,3-sioleiloxi)propil]-N,N,N-trimetilamonio, DMRIE, di-C14-amidina, DOTIM, SAINT, DC-Chol, BGTC, CTAP, DOPC, DODAP, DOPE: dioleil fosfatidiletanol-amina, DOSPA, DODAB, DOIC, DMEPC, DOGS: dioctadecilamidoglicilespermina, DIMRI: bromuro de dimiristo-oxipropil dimetil hidroxietil amonio, DOTAP: dioleoiloxi-3-(trimetilamonio)propano, DC-6-14: cloruro de O,O-ditetradecanoil-N-(α -trimetilamonioacetil)dietanolamina, CLIP1: cloruro de rac-[(2,3-dioctadeciloxipropil)(2-hidroxietil)]-dimetilamonio, CLIP6: rac-[2(2,3-dihexadeciloxipropil-oximetiloxi)etil]trimetilamonio, CLIP9: rac-[2(2,3-dihexadeciloxipropil-oxisucciniloxi)etil]-trimetilamonio, oligofectamina, o polímeros catiónicos o policationicos, incluyendo poliaminoácidos modificados, incluyendo polímeros de β -aminoácido o poliamidas inversas, polietilenos modificados, incluyendo PVP (bromuro de (poli)N-etil-4-vinilpiridinio), acrilatos modificados, incluyendo pDMAEMA (metacrilato de (poli)dimetilaminoetilo), amidoaminas modificadas, incluyendo pAMAM ((poli)amidoamina), polibetaaminoésteres modificados (PBAE), incluyendo polímeros de 1,4 butanodiol diacrilato-co-5-amino-1-pentanol modificados en el extremo con diamina, dendrímeros, incluyendo dendrímeros de polipropilamina o dendrímeros basados en pAMAM, poliimina(s), incluyendo PEI: (poli)etilenoimina, (poli)propilenoimina, polialilamina, polímeros basados en esqueleto de azúcar, incluyendo polímeros basados en ciclodextrina, polímeros basados en dextrano, quitosán, etc., polímeros basados en esqueleto de silano, tales como copolímeros de PMOXA-PDMS, etc., polímeros de bloques consistentes en una combinación de uno o más bloques catiónicos seleccionados entre un polímero catiónico tal como se menciona más arriba, y de uno o más bloques hidrófilos o hidrófobos (por ejemplo polietilenglicol);

o

péptidos o proteínas catiónicos o policationicos seleccionados entre los siguientes péptidos o proteínas que tienen la siguiente fórmula total (I): $(Arg)_i(Lys)_m(His)_n(Orn)_o(Xaa)_x$, en donde $I + m + n + o + x = 8-15$, y I, m, n u o pueden ser, independientemente entre sí, cualquier número seleccionado entre 0, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14 o 15, con la condición de que el contenido global de Arg, Lys, His y Orn represente al menos un 50% de todos los aminoácidos del oligopéptido; y Xaa puede ser cualquier aminoácido seleccionado entre aminoácidos nativos (= naturales) o no nativos, excepto Arg, Lys, His u Orn; y x puede ser cualquier número seleccionado entre 0, 1, 2, 3 o 4, con la condición de que el contenido global de Xaa no sobrepase el 50% de todos los aminoácidos del oligopéptido,

o

ácidos nucleicos que tienen la fórmula (II): $G_lX_mG_n$, en donde: G es guanosina, uridina o un análogo de guanosina o uridina; X es guanosina, uridina, adenosina, timidina, citidina o un análogo de los nucleótidos arriba mencionados; l es un número entero del 1 al 40, en donde, cuando $l = 1$, G es guanosina o un análogo de la misma, cuando $l > 1$, al menos un 50% de los nucleótidos son guanosina o un análogo de la misma; m es un número entero y es al menos 3; en donde, cuando $m = 3$, X es uridina o un análogo de la misma, cuando $m > 3$, están presentes al menos 3 uridinas o análogos de uridina sucesivos; n es un número entero del 1 al 40, en

donde, cuando $n = 1$, G es guanosina o un análogo de la misma, cuando $n > 1$, al menos un 50% de los nucleótidos son guanosina o un análogo de la misma;

o ácidos nucleicos que tienen la fórmula (III): $C_l X_m C_n$, en donde: C es citidina, uridina o un análogo de citidina o uridina; X es guanosina, uridina, adenosina, timidina, citidina o un análogo de los nucleótidos arriba mencionados; l es un número entero del 1 al 40, en donde, cuando $l = 1$, C es citidina o un análogo de la misma, cuando $l > 1$, al menos un 50% de los nucleótidos son citidina o un análogo de la misma; m es un número entero y es al menos 3; en donde, cuando $m = 3$, X es uridina o un análogo de la misma, cuando $m > 3$, están presentes al menos 3 uridinas o análogos de uridina sucesivos; n es un número entero del 1 al 40, en donde, cuando $n = 1$, C es citidina o un análogo de la misma, cuando $n > 1$, al menos un 50% de los nucleótidos son citidina o un análogo de la misma.

14. Vacuna que comprende una composición inmunoestimuladora activa de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 13, en donde la vacuna preferiblemente comprende un soporte farmacéuticamente aceptable.

15. Vacuna según la reivindicación 14, en donde la composición inmunoestimuladora activa de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 13 provoca una respuesta inmunitaria adaptativa.

16. Uso de la composición inmunoestimuladora activa según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 13 o de cuatro ARN que codifican en cada caso un antígeno diferente seleccionado entre STEAP, PSA, PSMA y PSCA tal como se define en cualquiera de las reivindicaciones 1 a 12 para preparar una vacuna para el tratamiento del cáncer de próstata (PCa), preferiblemente de cánceres de próstata refractarios a la terapia neoadyuvante y/u hormonal, y enfermedades o afecciones relacionadas con éstos.

17. Composición inmunoestimuladora activa según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 13 o cuatro ARN que codifican en cada caso un antígeno diferente seleccionado entre STEAP, PSA, PSMA y PSCA tal como se definen en cualquiera de las reivindicaciones 1 a 12 para utilizarlos como una vacuna para provocar una respuesta inmunitaria adaptativa en un mamífero.

18. *Kit* que comprende cuatro ARN tal como se definen en cualquiera de las reivindicaciones 1 a 12, que codifican cada uno un antígeno diferente seleccionado entre:

- STEAP (antígeno epitelial de seis dominios transmembrana de la próstata),
- PSA (antígeno prostático específico),
- PSMA (antígeno de membrana específico de próstata),
- PSCA (antígeno de células madre de próstata).

19. *Kit* según la reivindicación 18, en el que el *kit* consiste en un *kit* de partes, conteniendo cada parte un ARN que codifica un antígeno diferente, para una administración por separado.

- 20.** *Kit* según la reivindicación 18 o 19, para utilizarlo en un método de tratamiento del cáncer de próstata (PCa), preferiblemente de cánceres de próstata refractarios a la terapia neoadyuvante y/u hormonal, y enfermedades o afecciones relacionadas con éstos.

RNAActive CAP-KLK3(GC)-muag-A70-C30 = PSA

GGGAGAAAGCTTACCA**ATGT**GGGTGCCGGTCGTGTTCTGACCCTCAGCGTGACGTGGATCGGCGCCGCGCCCTG
ATCCTGTCGCGGATCGTGGGGGGCTGGGAGTGCGAGAAGCACAGCCAGCCCTGGCAGGTGCTGGTGGCCAGCCGC
GGCCGGGCCGTGTGCGGCGCGCTGCTGGTGCACCCCCAGTGGGTGCTGACCGCCGCCCACTGCATCCGGAACAAG
AGCGTCATCCTGCTGGGCCGGCACAGCCTGTTCCACCCCGAGGACACCGGCCAGGTGTTCCAGGTGAGCCACAGC
TTCCCCACCCCCTGTACGACATGAGCCTCCTGAAGAACCGGTTCTGCGGCCCGGCGACGACAGCAGCCACGAC
CTGATGCTGCTGCGGCTGAGCGAGCCCGCCGAGCTGACCGACGCCGTGAAGGTGATGGACCTGCCGACCCAGGAG
CCCGCCCTGGGCACCACCTGCTACGCCAGCGGCTGGGGGAGCATCGAGCCCGAGGAGTTCCTCACCCCCAAGAAG
CTGCAGTGCGTGGACCTGCACGTGATCAGCAACGACGTGTGCGCCCAGGTGCACCCCCAGAAGGTGACCAAGTTC
ATGCTGTGCGCCGGCCGGTGGACCGGCGGCAAGAGCACCTGCAGCGGCGACAGCGGCGGCCCCCTGGTCTGCAAC
GGCGTGCTGCAGGGCATCACCAGCTGGGGCAGCGAGCCCTGCGCCCTGCCCGAGCGCCCCAGCCTGTACACCAAG
GTGGTGCACTACCGGAAGTGGATCAAGGACACCATCGTGGCCAACCCG**TG**ACCACTAGTTATAAGACTGACTAGC
CCGATGGGCCTCCCAACGGGCCCTCCTCCCTCCTTGACCGAGATTAATAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA
AAATATCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCTC
TAGACAATTGAATT

Fig. 1

CDS KLK3 (wt) = PSA

ATGTGGGTCCCGGTTGTCTTCCTCACCCCTGTCCGTGACGTGGATTGGTGCTGCACCCCTCATCCTGTCTCGGATT
 GTGGGAGGCTGGGAGTGCAGAGAAGCATTTCCCAACCCTGGCAGGTGCTTGTGGCCTCTCGTGGCAGGGCAGTCTGC
 GGCGGTGTTCTGGTGCACCCCCAGTGGGTCCCTCACAGCTGCCCCTGCATCAGGAACAAAAGCGTGATCTTGCTG
 GGTCGGCACAGCCTGTTTCATCCTGAAGACACAGGCCAGGTATTTAGGTTCAGCCACAGCTTCCCACACCCGCTC
 TACGATATGAGCCTCCTGAAGAATCGATTCCCTCAGGCCAGGTGATGACTCCAGCCACGACCTCATGCTGCTCCGC
 CTGTCAGAGCCTGCCGAGCTCACGGATGCTGTGAAGGTCATGGACCTGCCACCCAGGAGCCAGCACTGGGGACC
 ACCTGCTACGCCTCAGGCTGGGGCAGCATTGAACCAGAGGAGTTCTTGACCCCAAAGAACTTCAGTGTGTGGAC
 CTCCATGTTATTTCCAATGACGTGTGTGCGCAAGTTCACCCCTCAGAAGGTGACCAAGTTCATGCTGTGTGCTGGA
 CGCTGGACAGGGGGCAAAGCACCTGCTCGGGTGATTCTGGGGGCCCACTTGTCTGTAATGGTGTGCTTCAAGGT
 ATCAGTCATGGGGCAGTGAACCATGTGCCCTGCCCGAAAGGCCTTCCCTGTACACCAAGGTGGTGCATTACCGG
 AAGTGGATCAAGGACACCATCGTGGCCAACCCCTGA

Fig. 2

ES 2 633 246 T3

CDS KLK3 (GC) = PSA

ATG TGG GTG CCC GTC GTG TTC CTG ACC CTC AGC GTG ACC TGG ATC GGC GCC GCC CCG
 CTG ATC CTG TCC CGG ATC GTC GGG GGC TGG GAG TGC GAG AAG CAC AGC CAG CCC TGG
 CAG GTG CTC GTG GCG TCC CGC GGG CGG GCC GTC TGC GGC GGG GTG CTG GTG CAC CCC
 CAG TGG GTC CTG ACG GCC GCC CAC TGC ATC CGC AAC AAG AGC GTG ATC CTC CTG GGC
 CGG CAC TCC CTG TTC CAC CCC GAG GAC ACC GGC CAG GTG TTC CAG GTC AGC CAC TCC
 TTC CCG CAC CCC CTC TAC GAC ATG AGC CTG CTG AAG AAC CGC TTC CTC CGG CCC GGG
 GAC GAC TCC AGC CAC GAC CTG ATG CTG CTC CGC CTG TCC GAG CCC GCC GAG CTG ACC
 GAC GCG GTG AAG GTG ATG GAC CTC CCG ACC CAG GAG CCC GCC CTG GGC ACG ACC TGC
 TAC GCC AGC GGG TGG GGC TCC ATC GAG CCC GAG GAG TTC CTG ACC CCC AAG AAG CTC
 CAG TGC GTC GAC CTG CAC GTG ATC AGC AAC GAC GTG TGC GCC CAG GTC CAC CCG CAG
 AAG GTG ACC AAG TTC ATG CTG TGC GCG GGG CGG TGG ACG GGC GGC AAG TCC ACC TGC
 AGC GGG GAC TCC GGC GGG CCC CTC GTG TGC AAC GGC GTC CTG CAG GGC ATC ACC AGC
 TGG GGG TCC GAG CCC TGC GCC CTG CCC GAG CGC CCG AGC CTC TAC ACC AAG GTG GTG
 CAC TAC CGG AAG TGG ATC AAG GAC ACG ATC GTC GCC AAC CCC TGA

Fig. 3

RNActiveII FOLH1(GC) = PSMA

GGGAGAAAGCTTACCA**ATGT**GGAACCTGCTCCACGAGACCGACAGCGCCGTGGCGACGGCCCGGCGCCCGCGGTGG
CTGTGCGCCGGCGCCCTGGTCCTGGCCGGGGGCTTCTTCTGCTGGGCTTCTGTTCGGCTGGTTCATCAAGTCG
AGCAACGAGGCCACCAACATCACCCCCAAGCACAAACATGAAGGCCTTCCTCGACGAGCTGAAGGCCGAGAACATC
AAGAAGTTCTGTACAACCTTCAACCAGATCCCCACCTGGCCGGGACCGAGCAGAACTTCAGCTGGCCAAGCAG
ATCCAGAGCCAGTGAAGGAGTTTCGGCCTGGACTCGGTGGAGCTGGCGCACTACGACGTGCTGCTCAGCTACCCC
AACAAGACCCACCCAACTACATCAGCATCATCAACGAGGACGGCAACGAGATCTTCAACACCAGCCTGTTTCGAG
CCCCCGCCCCCGGCTACGAGAACGTGTTCGGACATCGTGCCCCCTTCAGCGCCTTCAGCCCGCAGGGCATGCCC
GAGGGGGACCTGGTGTACGTGAACCTACGCCCCGACGGAGGACTTCTTCAAGCTGGAGCGCGACATGAAGATCAAC
TGCAGCGGCAAGATCGTGATCGCCCGGTACGGCAAGGTGTTCCGGGGCAACAAGGTGAAGAACGCCAGCTGGCC
GGGGCCAAGGGCGTGATCCTGTACTCGGACCCCGCGACTACTTCGCCCCGGCGTGAAGAGCTACCCCGACGGC
TGGAACCTGCCCCGGCGGGGGCGTCCAGCGCGCAACATCCTCAACCTGAACGGCGCCGGCGACCCGCTGACCCCC
GGGTACCCCGCGAACGAGTACGCCTACCGGCGGGGCATCGCCGAGGCCGTGGGCCTGCCAGCATCCCCGTGCAC
CCGATCGGCTACTACGACGCCCAGAAGCTGCTGGAGAAGATGGGCGGGAGCGCCCCGCCCCGACTCGAGCTGGCGG
GGCAGCCTGAAGGTGCCCTACAACGTGGGCCCGGCTTCACCGGGAACCTTCTCGACCCAGAAGGTGAAGATGCAC
ATCCACAGCACCAACGAGGTGACCCGCATCTACAACGTGATCGGCACCCTGCGGGGCGCCGTGGAGCCCGACCGG
TACGTGATCCTCGGCGGGCACCGCGACAGCTGGGTGTTTCGGCGGCATCGACCCCCAGAGCGGCGCCGCGGTGGTC
CACGAGATCGTGCGGTTCGTCGACCCCTGAAGAAGGAGGGGTGGCGGCCCGCCGGACGATCCTGTTTCGCCAGC
TGGGACGCGGAGGAGTTTCGGCCTGCTGGGCAGACCGAGTGGGCCGAGGAGAACAGCCGGCTGCTGCAGGAGCGG
GGCGTGGCCTACATCAACGCCGACTCGAGCATCGAGGGCAACTACACCCTCCGCGTGGACTGCACCCCGCTGATG
TACAGCCTGGTGCACAACCTGACCAAGGAGCTGAAGAGCCCCGACGAGGGGTTCGAGGGCAAGTCGCTGTACGAG
AGCTGGACCAAGAAGAGCCCCCTCGCCGAGTTTCAGCGGCATGCCCCGATCAGCAAGCTGGGCAGCGGGAACGAC
TTCGAGGTGTTCTTCCAGCGGTGGGCATCGCCTCGGGCCGCGCCCGGTACACCAAGAAGTGGGAGACGAACAAG
TTCAGCGGTACCCCTCTACCACAGCGGTACGAGACCTACGAGCTGGTGGAGAAGTTCTACGACCCCATGTTT
AAGTACCACCTGACCGTGGCCCAGGTGCGGGGCGGGATGGTGTTCGAGCTGGCCAACAGCATCGTGCTGCCCTTC
GACTGCCGCGACTACGCCGTGCTGCTGCGGAAGTACGCCGACAAGATCTACTCGATCAGCATGAAGCACCCCCAG
GAGATGAAGACCTACAGCGTGAGCTTCGACTCGCTGTTTCAGCGCGGTGAAGAACTTCACCGAGATCGCCAGCAAG
TTCTCGGAGCGGCTCCAGGACTTCGACAAGAGCAACCCGATCGTGCTGCGCATGATGAACGACCAGCTGATGTTT
CTGGAGCGGGCCTTCATCGACCCCTGGGCCTGCCCGACCGGCCCTTCTACCGGCACGTGATCTACGCCCCCAGC
AGCCACAACAAGTACGCCGGCGAGTCGTTCCCGGGGATCTACGACGCCCTGTTTCGACATCGAGAGCAAGGTGGAC
CCCAGCAAGGCCTGGGGCGAGGTGAAGCGCCAGATCTACGTGGCCGCTTCACCGTGCAGGCCGCGGCCGAGACC
CTGAGCGAGGTGGCCT**GA**CCACTAGTTATAAAGACTGACTAGCCCGATGGGCCTCCCAACGGGCCCTCCTCCCCCTC
CTTGACCGAGATTAATAAA
AAAAAATATTCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCTCTAGACAATTGGAATT

Fig. 4

CDS FOLH1 (wt) = PSMA

ATGTGGAATCTCCTTCACGAAACCGACTCGGCTGTGGCCACCGCGCGCCGCCGCGCTGGCTGTGCGCTGGGGCG
CTGGTGCTGGCGGGTGGCTTCTTTCTCCTCGGCTTCTCTTCGGGTGGTTTATAAAATCCTCCAATGAAGCTACT
AACATTACTCCAAAGCATAATATGAAAGCATTTTGGATGAATTGAAAGCTGAGAACATCAAGAAGTTCTTATAT
AATTTTACACAGATACCACATTTAGCAGGAACAGAACAAAACCTTTCAGCTTGCAAAGCAAATTCATCCCCAGTGG
AAAGAATTTGGCCTGGATTCTGTTGAGCTAGCACATTATGATGTCTGTTGTCCTACCCAAATAAGACTCATCCC
AACTACATCTCAATAATTAATGAAGATGGAAATGAGATTTTCAACACATCATTATTTGAACCACCTCCTCCAGGA
TATGAAAATGTTTCGGATATTGTACCACCTTTCAGTGCTTTCTCTCCTCAAGGAATGCCAGAGGGCGATCTAGTG
TATGTTAACTATGCACGAACTGAAGACTTCTTTAAATTGGAACGGGACATGAAAATCAATTGCTCTGGGAAAATT
GTAATTGCCAGATATGGGAAAGTTTTAGAGGAAATAAGGTTAAAAATGCCAGCTGGCAGGGGCCAAAGGAGTC
ATTCTCTACTCCGACCTGTGACTACTTTGCTCCTGGGGTGAAGTCTATCCAGATGGTTGGAATCTTCTGGA
GGTGGTGTCAGCGTGGAAATATCCTAAATCTGAATGGTGCAGGAGACCCTCTCACACCAGGTTACCCAGCAAAT
GAATATGCTTATAGGCGTGAATTCAGAGGCTGTTGGTCTTCCAAGTATTCTGTTTCATCCAATTGGATACTAT
GATGCACAGAAGCTCCTAGAAAAAATGGGTGGCTCAGCACCACCAGATAGCAGCTGGAGAGGAAGTCTCAAAGTG
CCCTACAATGTTGGACCTGGCTTTACTGGAACTTTTCTACACAAAAAGTCAAGATGCACATCCACTCTACCAAT
GAAGTGACAAGAATTTACAATGTGATAGGTACTCTCAGAGGAGCAGTGGAACCAGACAGATATGTCAATCTGGA
GGTCACCGGGACTCATGGGTGTTTGGTGGTATTGACCCTCAGAGTGGAGCAGCTGTTGTTTCATGAAATTGTGAGG
AGCTTTGGAACACTGAAAAAGGAAGGGTGGAGACCTAGAAGAACAATTTTGTGTTGCAAGCTGGGATGCAGAAGAA
TTTGGTCTTCTTGGTCTACTGAGTGGGCAGAGGAGAATTCAAGACTCCTTCAAGAGCGTGGCGTGGCTTATATT
AATGCTGACTCATCTATAGAAGGAACTACACTCTGAGAGTTGATTGTACACCGCTGATGTACAGCTTGGTACAC
AACCTAACAAAAGAGCTGAAAAGCCCTGATGAAGGCTTTGAAGGCAAATCTCTTTATGAAAGTTGGACTAAAAAA
AGTCCTTCCCCAGAGTTCAGTGGCATGCCCAGGATAAGCAAATTGGGATCTGGAAATGATTTTGAGGTGTTCTTC
CAACGACTTGGAATTGCTTCAGGCAGAGCACGGTATACTAAAAATTGGGAAACAAACAAATTCAGCGGCTATCCA
CTGTATCACAGTGTCTATGAAACATATGAGTTGGTGGAAAAGTTTTATGATCCAATGTTTAAATATCACCTCACT
GTGGCCAGGTTTCAGAGGAGGATGGTGTGTTGAGCTAGCCAATTCATAGTGCTCCCTTTTGATTGTCGAGATTAT
GCTGTAGTTTTAAGAAAGTATGCTGACAAAATCTACAGTATTTCTATGAAACATCCACAGGAAATGAAGACATAC
AGTGATCATTTGATTCACTTTTTCTGCAGTAAAGAATTTTACAGAAATTGCTTCCAAGTTCAGTGAGAGACTC
CAGGACTTTGACAAAAGCAACCCAATAGTATTAAGAATGATGAATGATCAACTCATGTTTCTGGAAAGAGCATTT
ATTGATCCATTAGGGTTACCAGACAGGCCTTTTTATAGGCATGTCATCTATGCTCCAAGCAGCCACAACAAGTAT
GCAGGGGAGTCATTCCCAGGAATTTATGATGCTCTGTTTGATATTGAAAGCAAAGTGGACCCTTCCAAGGCCTGG
GGAGAAGTGAAGAGACAGATTTATGTTGCAGCCTTCACAGTGCAGGCAGCTGCAGAGACTTTGAGTGAAGTAGCC
TAA

Fig. 5

CDS FOLH1 (GC) = PSMA

ATG TGG AAC CTG CTC CAC GAG ACC GAC AGC GCC GTG GCC ACC GCG CGG CGC CCC CGG
 TGG CTG TGC GCC GGC GCC CTG GTC CTC GCC GGG GGC TTC TTC CTG CTG GGG TTC CTC
 TTC GGC TGG TTC ATC AAG TCC AGC AAC GAG GCC AGC AAC ATC ACC CCG AAG CAC AAC
 ATG AAG GCG TTC CTG GAC GAG CTG AAG GCC GAG AAC ATC AAG AAG TTC CTC TAC AAC
 TTC ACC CAG ATC CCC CAC CTG GCC GGG ACC GAG CAG AAC TTC CAG CTG GCC AAG CAG
 ATC CAG TCC CAG TGG AAG GAG TTC GGC CTC GAC AGC GTG GAG CTG GCG CAC TAC GAC
 GTG CTG CTC TCC TAC CCC AAC AAG ACG CAC CCC AAC TAC ATC AGC ATC ATC AAC GAG
 GAC GGC AAC GAG ATC TTC AAC ACC TCC CTG TTC GAG CCG CCC CCC CCC GGG TAC GAG
 AAC GTC AGC GAC ATC GTG CCG CCC TTC TCC GCC TTC AGC CCC CAG GGC ATG CCC GAG
 GGG GAC CTG GTG TAC GTC AAC TAC GCC CGC ACC GAG GAC TTC TTC AAG CTC GAG CGG
 GAC ATG AAG ATC AAC TGC TCC GGC AAG ATC GTG ATC GCC CGC TAC GGC AAG GTG TTC
 CGG GGC AAC AAG GTC AAG AAC GCC CAG CTG GCG GGC GCC AAG GAG ATC CTG TAC
 AGC GAC CCG GCC GAC TAC TTC GCC CCC GGC GTG AAG TCC TAC CCC GAC GGG TGG AAC
 CTC CCC GGC GGC GGG GTC CAG CGC GGC AAC ATC CTG AAC CTG AAC GGG GCC GGC GAC
 CCG CTC ACC CCC GGG TAC CCC GCG AAC GAG TAC GCC TAC CGG CGC GGC ATC GCC GAG
 GCC GTG GGC CTG CCC AGC ATC CCG GTG CAC CCC ATC GGG TAC TAC GAC GCC CAG AAG
 CTG CTC GAG AAG ATG GGC GGG TCC GCG CCC CCC GAC AGC TCC TGG CGG GGC AGC CTG
 AAG GTC CCG TAC AAC GTG GGG CCC GGC TTC ACG GGC AAC TTC TCC ACC CAG AAG GTG
 AAG ATG CAC ATC CAC AGC ACC AAC GAG GTC ACC CGC ATC TAC AAC GTG ATC GGG ACG
 CTG CGG GGC GCC GTG GAG CCC GAC CGC TAC GTC ATC CTC GGG GGC CAC CGG GAC AGC
 TGG GTG TTC GGG GGC ATC GAC CCC CAG TCC GGC GCC GCC GTG GTC CAC GAG ATC GTG
 CGC AGC TTC GGG ACC CTG AAG AAG GAG GGC TGG CGG CCG CGC CGG ACC ATC CTG TTC
 GCC TCC TGG GAC GCG GAG GAG TTC GGG CTC CTG GGC AGC ACC GAG TGG GCC GAG GAG
 AAC TCC CGC CTG CTC CAG GAG CGG GGC GTC GCC TAC ATC AAC GCC GAC AGC TCC ATC
 GAG GGG AAC TAC ACG CTG CGC GTG GAC TGC ACC CCG CTG ATG TAC AGC CTC GTG CAC
 AAC CTG ACC AAG GAG CTG AAG TCC CCC GAC GAG GGC TTC GAG GGG AAG AGC CTC TAC
 GAG TCC TGG ACC AAG AAG AGC CCG TCC CCC GAG TTC AGC GGC ATG CCC CGG ATC TCC
 AAG CTG GGG AGC GGC AAC GAC TTC GAG GTC TTC TTC CAG CGG CTG GGC ATC GCG TCC
 GGG CGC GCC CGG TAC ACG AAG AAC TGG GAG ACC AAC AAG TTC AGC GGC TAC CCC CTC
 TAC CAC TCC GTG TAC GAG ACC TAC GAG CTG GTG GAG AAG TTC TAC GAC CCG ATG TTC
 AAG TAC CAC CTG ACC GTC GCC CAG GTG CGC GGG GGC ATG GTG TTC GAG CTG GCC AAC
 AGC ATC GTC CTC CCC TTC GAC TGC CGG GAC TAC GCC GTG GTG CTG CGC AAG TAC GCG
 GAC AAG ATC TAC AGC ATC TCC ATG AAG CAC CCC CAG GAG ATG AAG ACG TAC AGC GTC
 TCC TTC GAC AGC CTG TTC TCC GCC GTG AAG AAC TTC ACC GAG ATC GCC AGC AAG TTC
 TCC GAG CGG CTC CAG GAC TTC GAC AAG AGC AAC CCC ATC GTG CTG CGC ATG ATG AAC
 GAC CAG CTG ATG TTC CTC GAG CGG GCC TTC ATC GAC CCG CTG GGG CTG CCC GAC CGC
 CCC TTC TAC CGG CAC GTC ATC TAC GCC CCC TCC AGC CAC AAC AAG TAC GCG GGC GAG
 TCC TTC CCG GGG ATC TAC GAC GCC CTC TTC GAC ATC GAG AGC AAG GTG GAC CCC TCC
 AAG GCC TGG GGC GAG GTG AAG CGC CAG ATC TAC GTC GCC GCC TTC ACC GTG CAG GCG
 GCC GCC GAG ACC CTG AGC GAG GTG GCC TGA

Fig. 6

RNActiveII PSCA(GC)

GGGAGAAAGCTTACCA**ATGA**AGGCCGTGCTGCTCGCGCTGCTGATGGCCGGCCTGGCCCTGCAGCCGGGGACCGCC
 CTGCTGTGCTACAGCTGCAAGGCCAGGTCTCGAACGAGGACTGCCTGCAGGTGGAGAACTGCACGCAGCTGGGC
 GAGCAGTGCTGGACCGCCCGGATCCGCGCCGTGGGCCTGCTCACCGTGATCAGCAAGGGCTGCAGCCTGAACTGC
 GTGGACGACAGCCAGGACTACTACGTGGGCAAGAAGAACATCACCTGCTGCGACACCGACCTGTGCAACGCCAGC
 GGCGCCACGCCCTGCAGCCCGCGGCCGCCATCCTGGCCCTGCTGCCC GCCCTGGGCCTGCTGCTCTGGGGCCCC
 GGCCAGCTGT**TGACCA**CTAGTTATAAGACTGACTAGCCCGATGGGCCTCCCAACGGGCCCTCCTCCCCTCCTTGCA
 CCGAGATTAATAA
 TATTCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCTCTAGACAATTGGAATT

Fig. 7

CDS PSCA (wt)

ATGAAGGCTGTGCTGCTTGCCCTGTTGATGGCAGGCTTGGCCCTGCAGCCAGGCACTGCCCTGCTGTGCTACTCC
TGCAAAGCCCAGGTGAGCAACGAGGACTGCCTGCAGGTGGAGAAGTGCACCCAGCTGGGGGAGCAGTGCTGGACC
GCGCGCATCCGCGCAGTTGGCCTCCTGACCGTCATCAGCAAAGGCTGCAGCTTGAAGTGCCTGGATGACTCACAG
GACTACTACGTGGGCAAGAAGAACATCACGTGCTGTGACACCGACTTGTGCAACGCCAGCGGGGGCCATGCCCTG
CAGCCGGCTGCTGCCATCCTTGCGCTGCTCCCTGCACTCGGCCTGCTGCTCTGGGGACCCGGCCAGCTCTAG

Fig. 8

CDS PSCA(GC)

ATG AAG GCC GTG CTG CTC GCC CTG CTG ATG GCG GGC CTC GCC CTG CAG CCC GGG ACC
 GCC CTG CTC TGC TAC AGC TGC AAG GCC CAG GTC TCC AAC GAG GAC TGC CTG CAG GTG
 GAG AAC TGC ACC CAG CTG GGC GAG CAG TGC TGG ACG GCC CGG ATC CGC GCG GTG GGG
 CTC CTG ACC GTC ATC AGC AAG GGC TGC TCC CTG AAC TGC GTG GAC GAC AGC CAG GAC
 TAC TAC GTG GGG AAG AAG AAC ATC ACC TGC TGC GAC ACC GAC CTC TGC AAC GCC TCC
GGC GCC CAC GCC CTG CAG CCG GCG GCC GCC ATC CTG GCC CTC CTG CCC GCC CTG GGC
CTC CTG CTG TGG GGG CCC GGC CAG CTC TGA

Fig. 9

RNActive II STEAP (GC) = STEAP1

GGGagaAAGCTTacc**ATG**gagagccggaaggacatcaccaaccaggaggagctgtggaagatgaagccgcgccg
aacctcgaggaggacgactacctgcacaaggacacgggagacctcgatgctgaagcggcccgctgctcctgcac
ctgcaccagaccgcccacgcggacgagttcgactgcccagcagctccagcacacgcaggagctgttcccgcag
tggcacctgcccacatcaagatcgccgcatcatcgcgagcctcaccttcctgtacaccctgctccgcgaggtcatc
caccgcgtggccacgtcgaccagcagtaacttctacaagatcccgatcctggtgatcaacaaggtgctccccatg
gtcagcatcacctgctggccctcgtgtacctgcccgggggtgatcgcgcccatcgctccagctgcacaacggcacc
aagtacaagaagttcccgcactggctcgacaagtggatgctgacgcggaagcagttcggcctgctcagcttcttc
ttcgccgtgctgcacgcgatctactcgtgagctaccccatgcccgcagctaccggtacaagctcctgaactgg
gcctaccagcaggtgcagcagaacaaggaggacgcctggatcgagcacgacgtctggcggtggagatctacgtg
tcgctggggatcggtggcctcgcatcctggccctgctcgccgtcaccagcatcccgagcgtgctggacagcctg
acctggcgcgagttccactacatccagagcaagctgggcatcggtcgtcgtcctgctggggacgatccacgcgctc
atcttcgcctggaacaagtggatcgacatcaagcagttcgtctggtacacccgcccaccttcatgatcgccgtg
ttcctgccgatcggtgctcctgatcttcaagagcatcctcttcctgccgtgctgccaagaagatcctcaagatc
cggcacggctgggaggacgtgacgaagatcaacaagaccgagatctgcagccagctg**tgacc**ACTAGTTATAAga
ctgactagcccgAtgggcctcccaacggggccctcctccctccttgaccgagAttaaTAAAAAAAAAAAAAAAAA
AAAatattCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCC
CCCCCtctagaCAATTGgaatt

Fig. 10

CDS STEAP(wt) = STEAP1

ATGGAAAGCAGAAAAGACATCACAAACCAAGAAGAACTTTGGAAAAATGAAGCCTAGGAGAAAATTTAGAAGAAGAC
GATTATTTGCATAAGGACACGGGAGAGACCAGCATGCTAAAAAGACCTGTGCTTTTGCATTTGCACCAAACAGCC
CATGCTGATGAATTTGACTGCCCTTCAGAACTTCAGCACACACAGGAACTCTTCCACAGTGGCACTTGCCAATT
AAAATAGCTGCTATTATAGCATCTCTGACTTTTCTTTTACACTCTTCTGAGGGAAGTAATTCACCCCTTTAGCAACT
TCCCATCAACAATATTTTTATAAAATTCCAATCCTGGTCATCAACAAAGTCTTGCCAATGGTTTCCATCACTCTC
TTGGCATTGGTTTACCTGCCAGGTGTGATAGCAGCAATTGTCCAACCTTCATAATGGAACCAAGTATAAGAAGTTT
CCACATTGGTTGGATAAGTGGATGTTAACAAGAAAGCAGTTTGGGCTTCTCAGTTTCTTTTTTGCTGTACTGCAT
GCAATTTATAGTCTGTCTTACCCAATGAGGCGATCCTACAGATACAAGTTGCTAAACTGGGCATATCAACAGGTC
CAACAAAATAAAGAAGATGCCTGGATTGAGCATGATGTTTGAGAATGGAGATTTATGTGTCTCTGGGAATTGTG
GGATTGGCAATACTGGCTCTGTTGGCTGTGACATCTATTCCATCTGTGAGTGACTCTTTGACATGGAGAGAATTT
CACTATATTCAGAGCAAGCTAGGAATTGTTTCCCTTCTACTGGGCACAATACACGCATTGATTTTTGCCTGGAAT
AAGTGGATAGATATAAAACAATTTGTATGGTATACACCTCCAACCTTTATGATAGCTGTTTTCCCTTCCAATTGTT
GTCCTGATATTTAAAAGCATACTATTCCCTGCCATGCTTGAGGAAGAAGATACTGAAGATTAGACATGGTTGGGAA
GACGTCACCAAATTAACAAAACCTGAGATATGTTCCCAGTTGTAG

Fig. 11

CDS STEAP(GC) = STEAP1

ATG GAG AGC CGG AAG GAC ATC ACC AAC CAG GAG GAG CTG TGG AAG ATG AAG CCC CGC
CGG AAC CTC GAG GAG GAC GAC TAC CTG CAC AAG GAC ACC GGC GAG ACG TCC ATG CTG
 AAG CGC CCG GTG CTC CTG CAC CTG CAC CAG ACC GCC CAC GGC GAG TTC GAC TGC
 CCC AGC GAG CTC CAG CAC ACC CAG GAG CTG TTC CCC CAG TGG CAC CTG CCC ATC AAG
 ATC GCG GCC ATC ATC GCC TCC CTC ACC TTC CTG TAC ACG CTG CTC CGG GAG GTC ATC
 CAC CCG CTG GCC ACC AGC CAC CAG CAG TAC TTC TAC AAG ATC CCC ATC CTG GTG ATC
 AAC AAG GTG CTC CCC ATG GTC TCC ATC ACC CTG CTG GCC CTC GTG TAC CTG CCC GGG
 GTG ATC GCG GCC ATC GTC CAG CTG CAC AAC GGC ACC AAG TAC AAG AAG TTC CCG CAC
 TGG CTC GAC AAG TGG ATG CTG ACG CGC AAG CAG TTC GGG CTG CTC AGC TTC TTC TTC
 GCC GTG CTG CAC GCC ATC TAC TCC CTG AGC TAC CCC ATG CGG CGC TCC TAC CGG TAC
 AAG CTC CTG AAC TGG GCG TAC CAG CAG GTG CAG CAG AAC AAG GAG GAC GCC TGG ATC
 GAG CAC GAC GTC TGG CGC ATG GAG ATC TAC GTG AGC CTG GGC ATC GTG GGG CTC GCC
 ATC CTG GCC CTG CTC GCC GTC ACC TCC ATC CCC AGC GTG TCC GAC AGC CTG ACC TGG
CGG GAG TTC CAC TAC ATC CAG TCC AAG CTG GGC ATC GTG AGC CTC CTG GGC ACC
 ATC CAC GCG CTC ATC TTC GCC TGG AAC AAG TGG ATC GAC ATC AAG CAG TTC GTC TGG
 TAC ACG CCC CCG ACC TTC ATG ATC GCC GTG TTC CTG CCC ATC GTG GTC CTG ATC TTC
 AAG TCC ATC CTC TTC CTG CCC TGC CTG CGC AAG AAG ATC CTC AAG ATC CGG CAC GGG
 TGG GAG GAC GTG ACC AAG ATC AAC AAG ACC GAG ATC TGC AGC CAG CTG TGA

Fig. 12

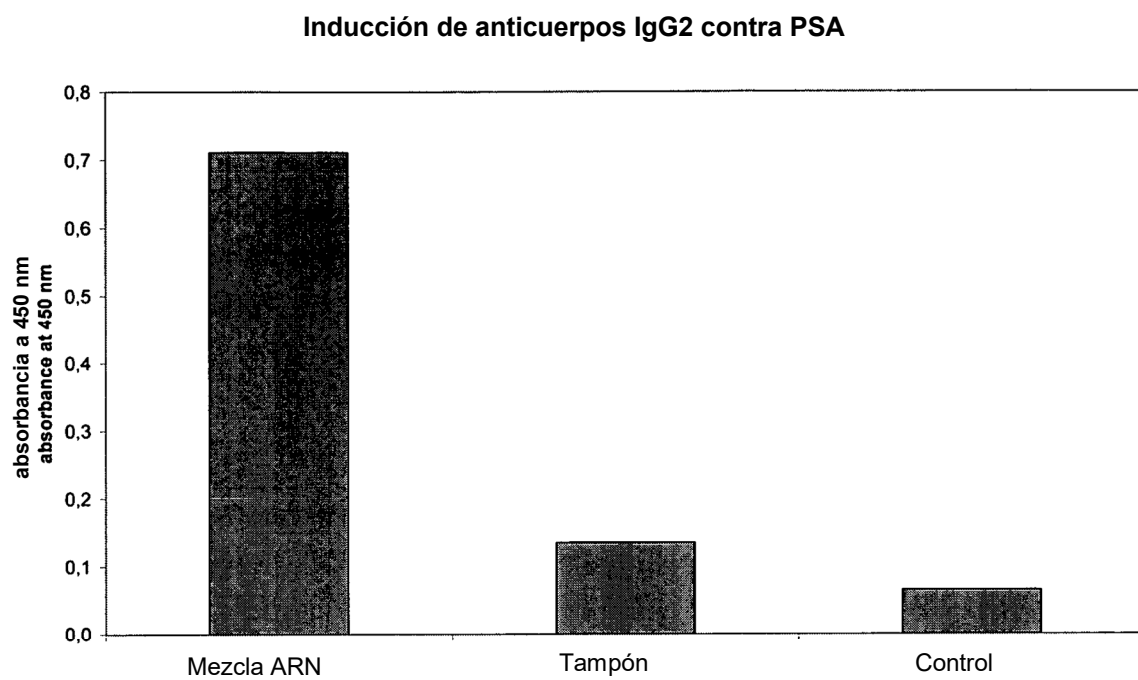


Fig. 13

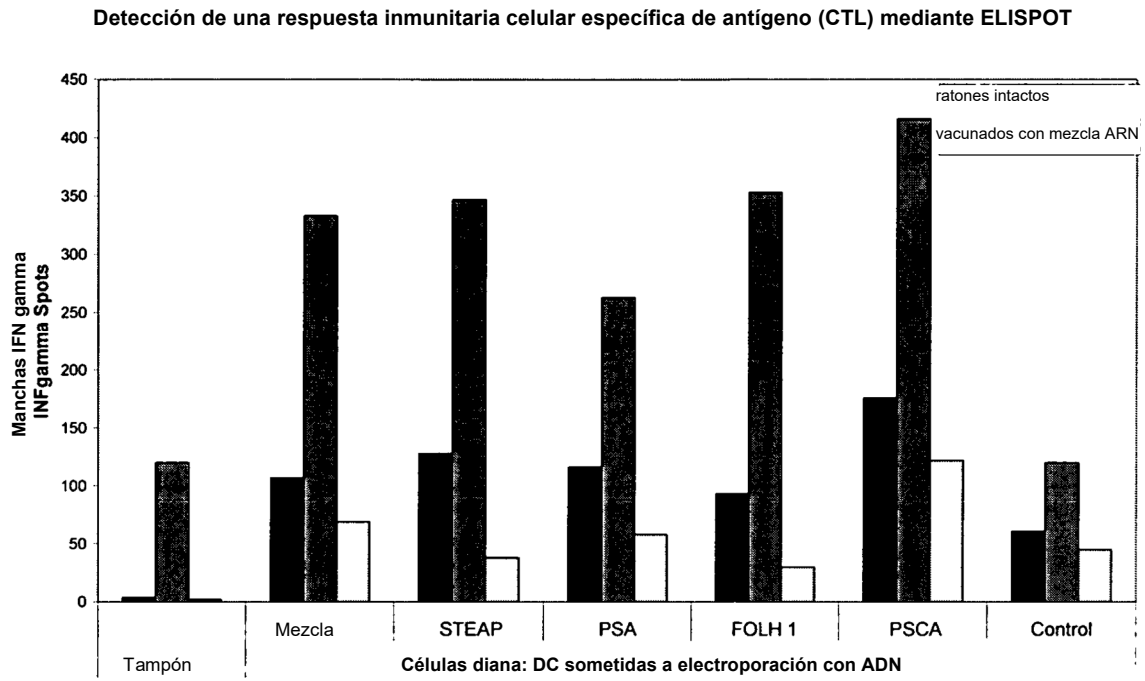


Fig. 14

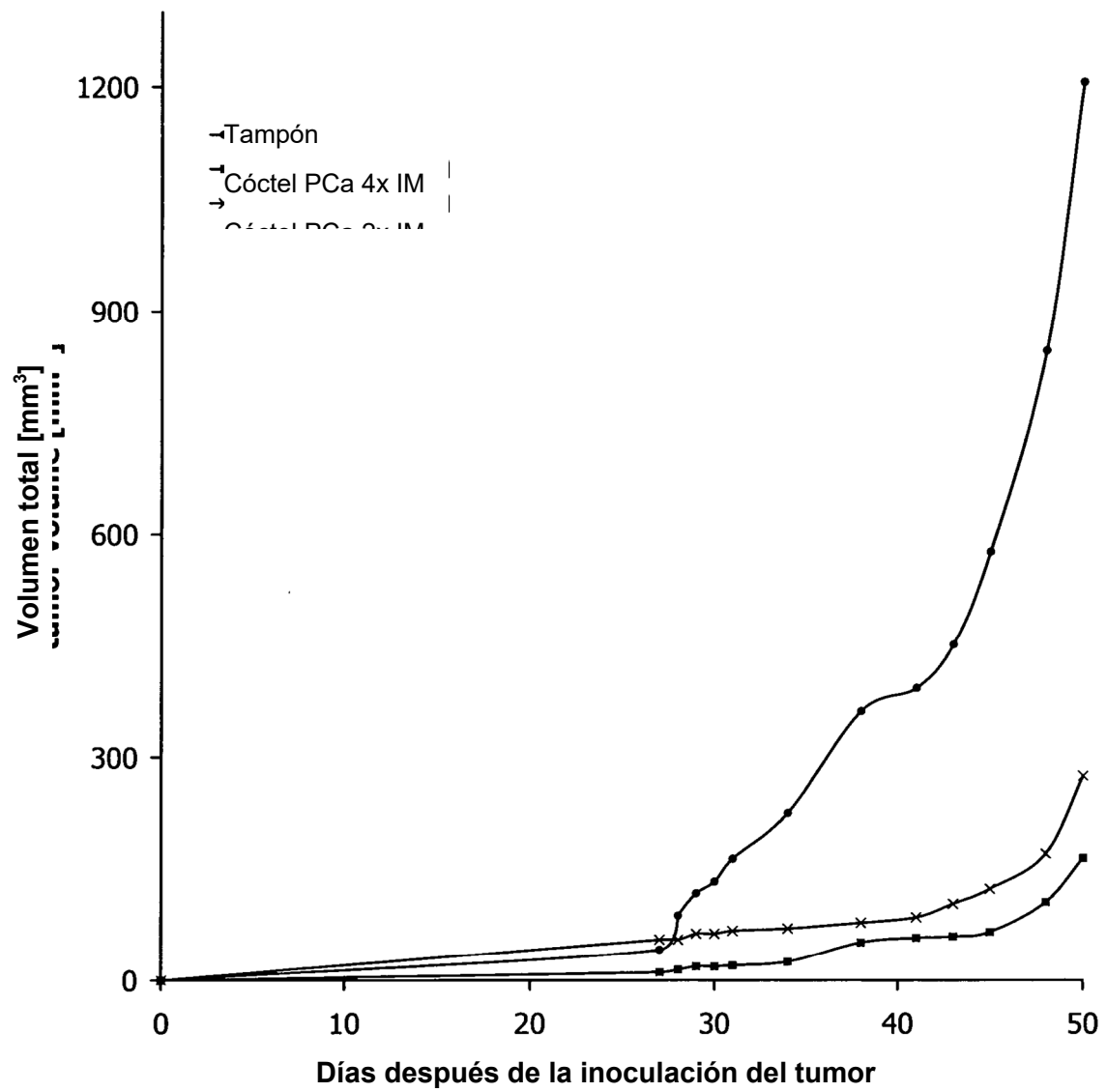


Fig. 15

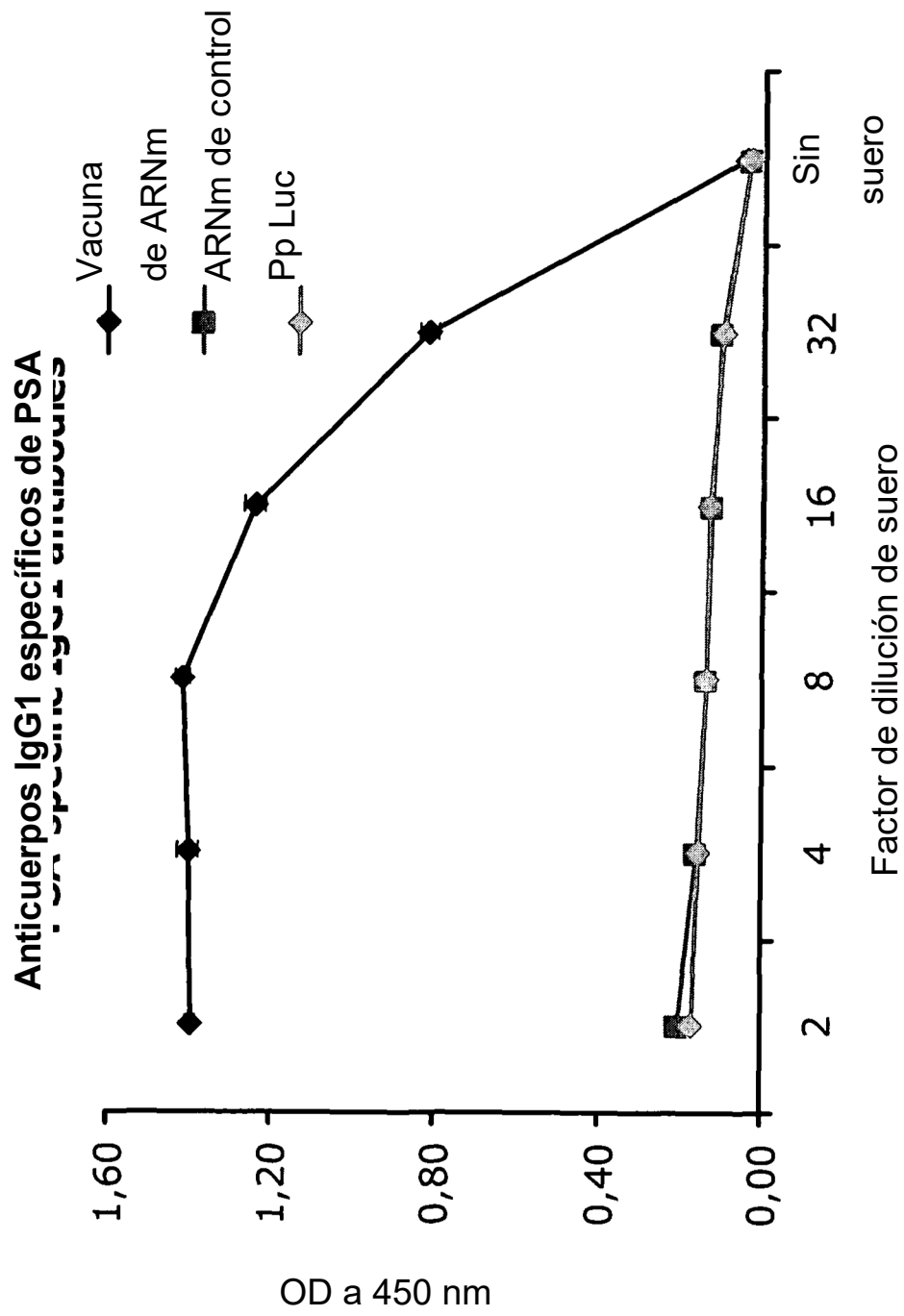


Fig. 16

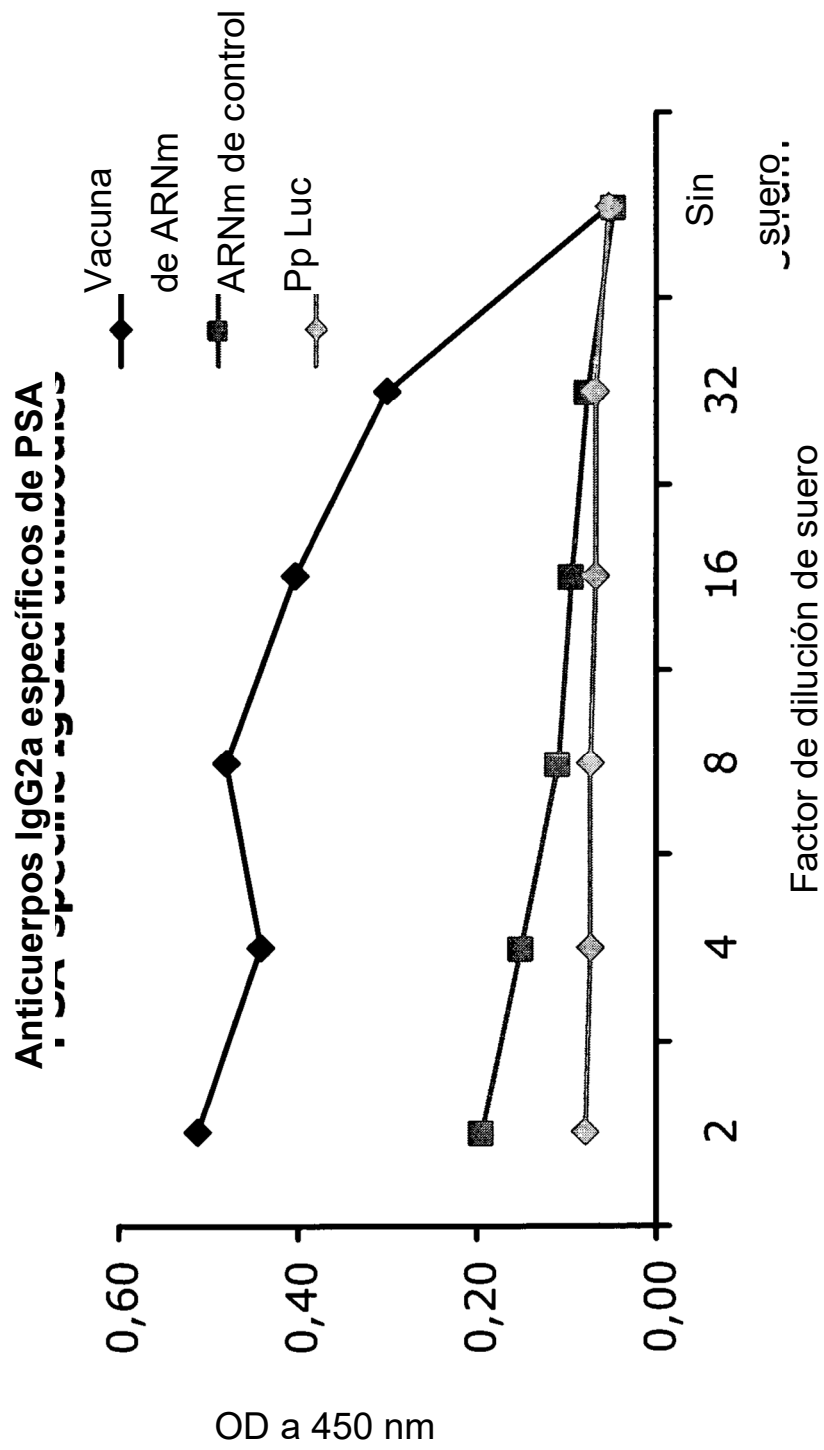


Fig. 17

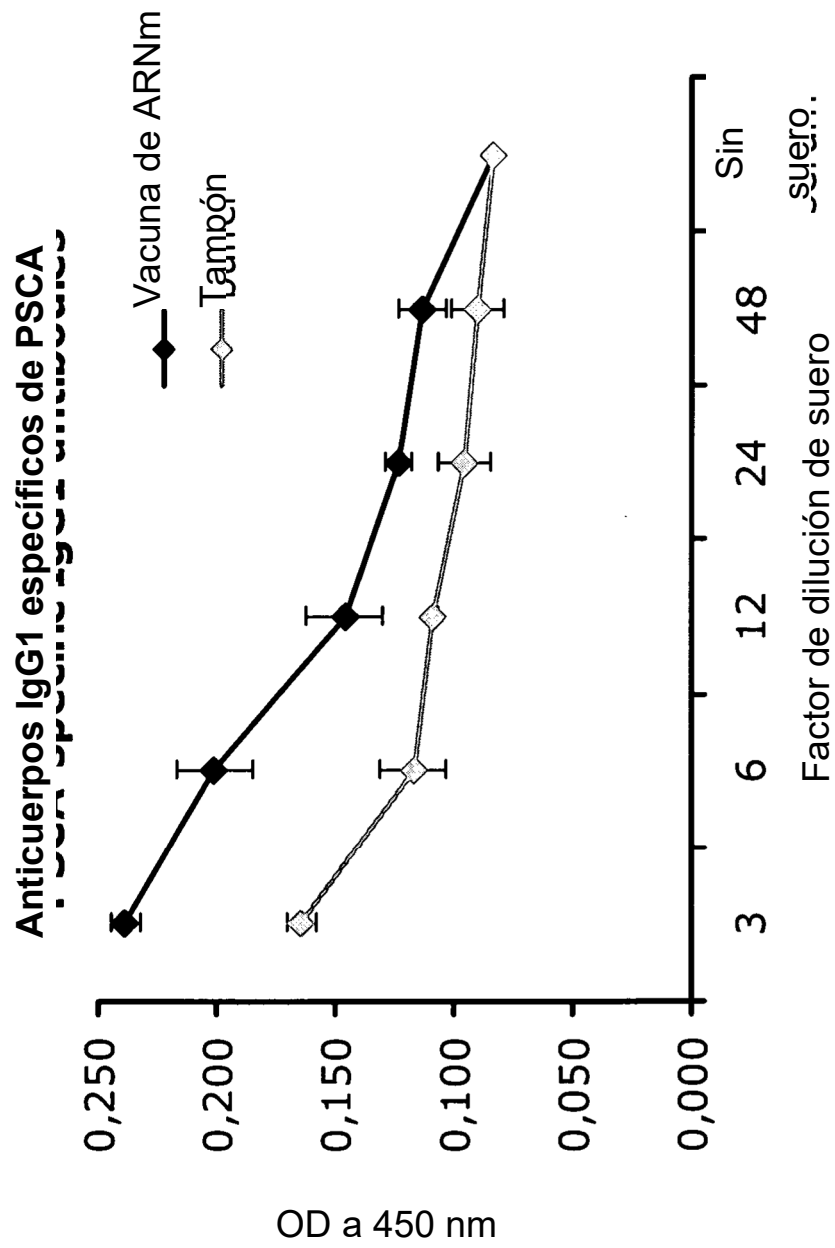


Fig. 18

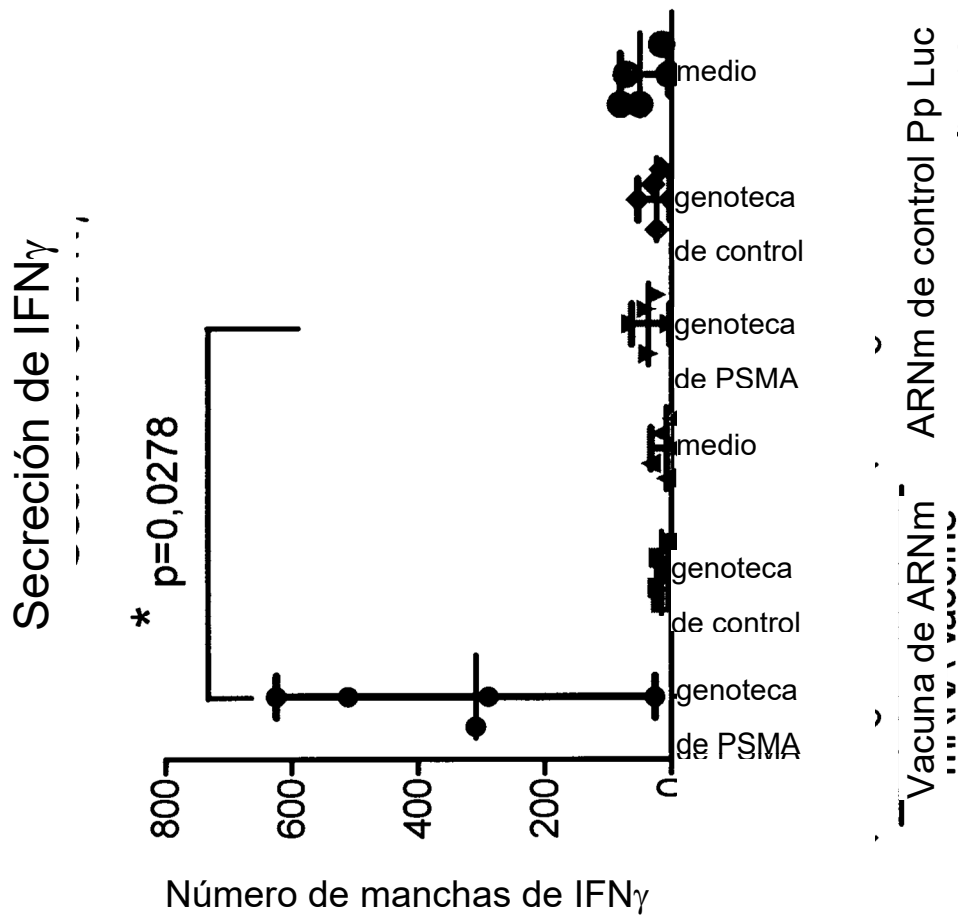


Fig. 19

Citotoxicidad *in vivo* inducida por PSMA

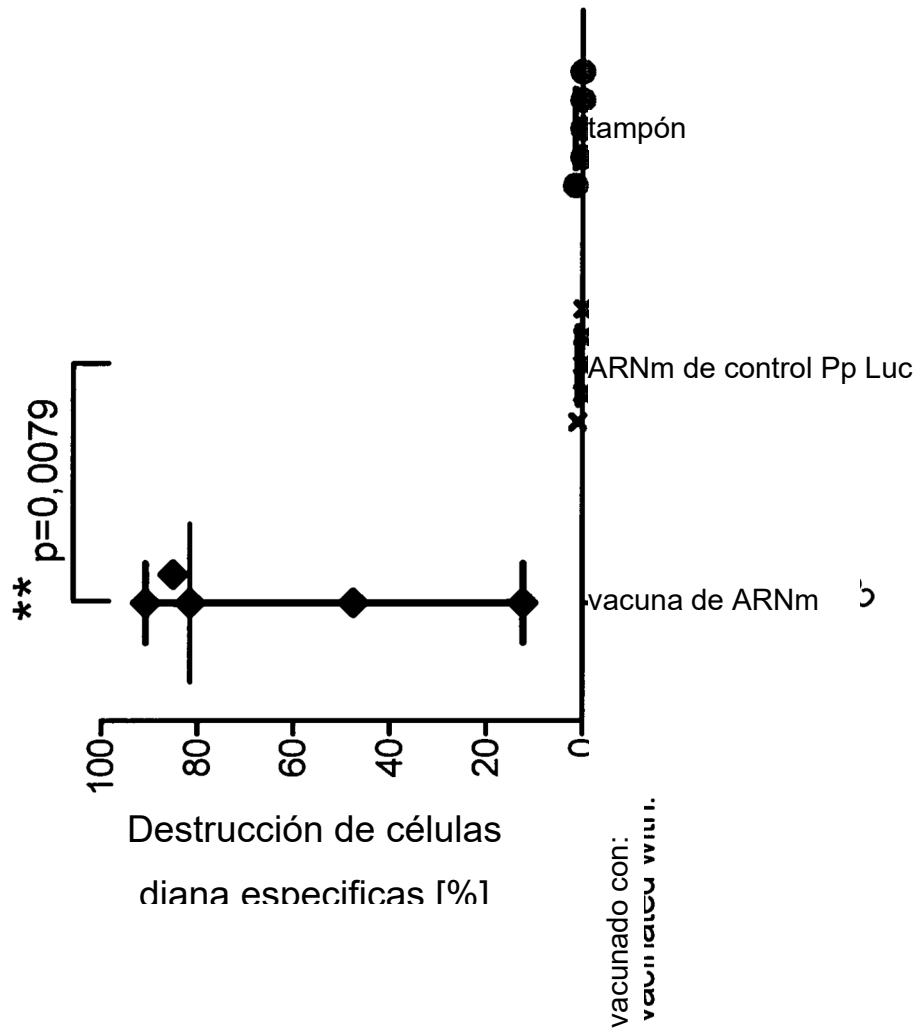


Fig. 20

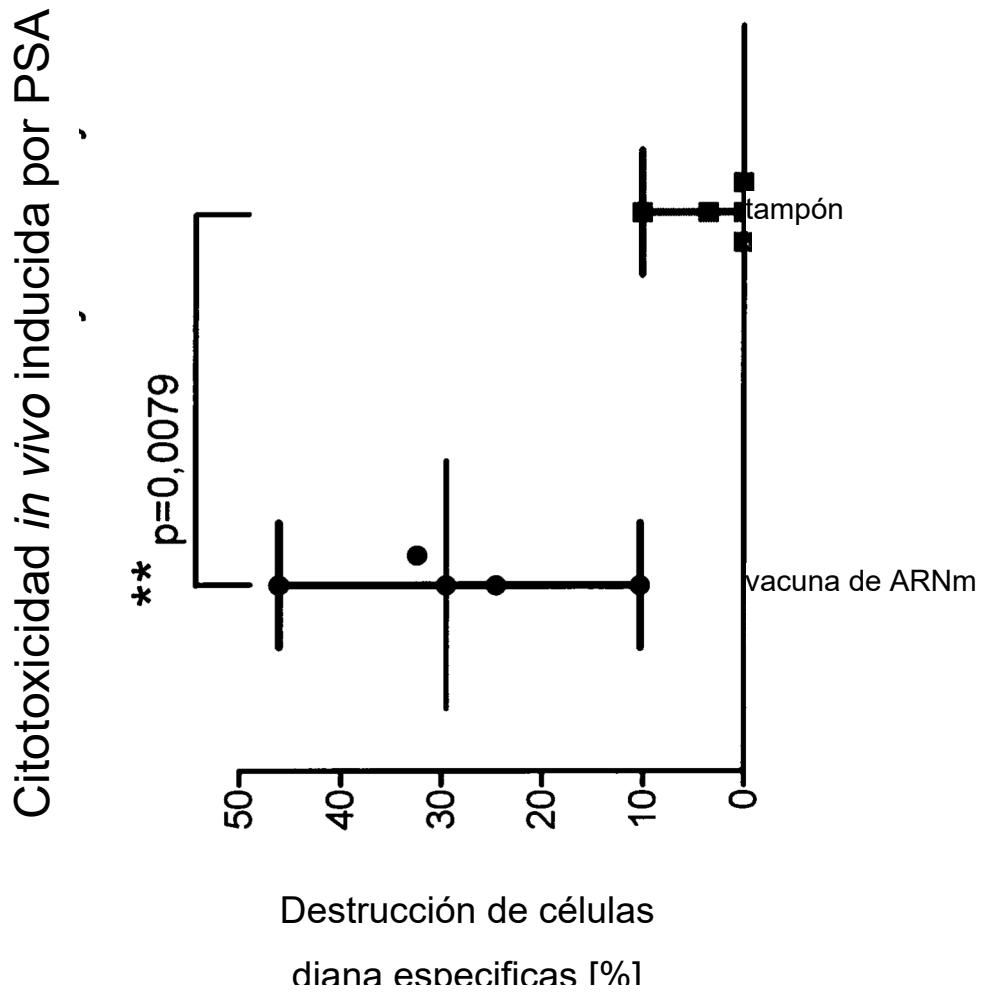


Fig. 21

Citotoxicidad *in vivo* inducida por PSCA

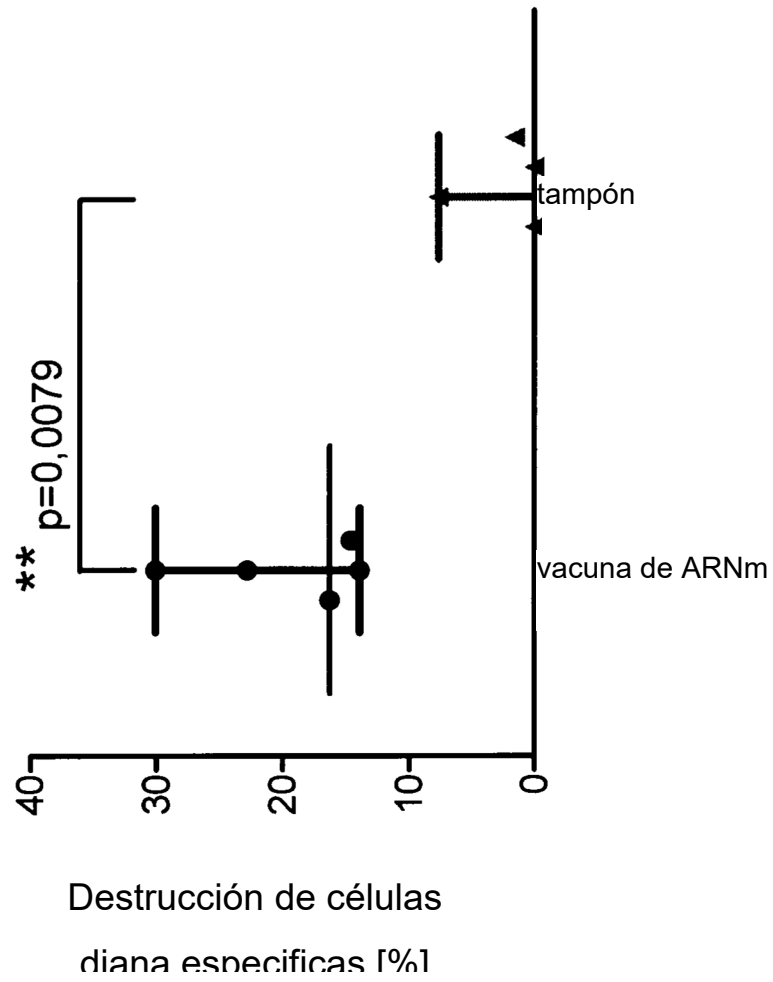


Fig. 22

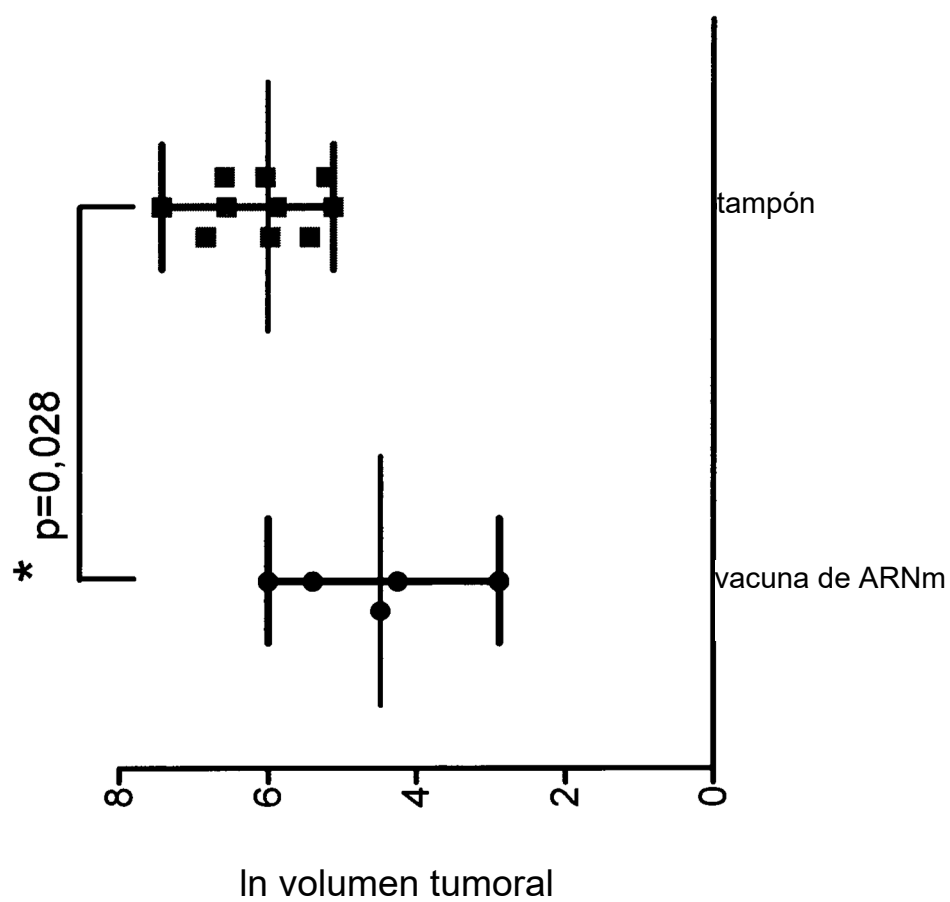


Fig. 23