

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 668 926**

51 Int. Cl.:

A61K 39/00 (2006.01)

C12N 15/12 (2006.01)

A61P 35/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **08.10.2008 PCT/EP2008/008503**

87 Fecha y número de publicación internacional: **16.04.2009 WO09046974**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **08.10.2008 E 08838033 (2)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **14.02.2018 EP 2197481**

54 Título: **Composición de ARN para el tratamiento del cáncer pulmonar de células no pequeñas (NSCLC)**

30 Prioridad:
09.10.2007 WO PCT/EP2007/008770

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
23.05.2018

73 Titular/es:
CUREVAC AG (100.0%)
Paul-Ehrlich-Str. 15
72076 Tübingen, DE

72 Inventor/es:
BARNER, MARIJKE;
PROBST, JOCHEN;
LANDER, THOMAS y
HOERR, INGMAR

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 2 668 926 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 de ARN para el tratamiento del cáncer pulmonar de células no pequeñas (NSCLC)

5

La presente invención se refiere a una composición activa inmunoestimuladora que comprende cinco ARNm que codifican para al menos cinco antígenos diferentes capaces de provocar una respuesta inmune (adaptativa) en un mamífero. La invención también se refiere a una vacuna que comprende dicha composición activa inmunoestimuladora y al uso de dicha composición activa
 10 inmunoestimuladora para la preparación de una vacuna y/o de la vacuna para provocar una respuesta inmune (adaptativa) para el tratamiento del cáncer de pulmón de células no pequeñas (NSCLC), preferiblemente seleccionadas de los tres subtipos principales carcinoma pulmonar de células escamosas, adenocarcinoma y carcinoma pulmonar de células grandes, o de sus trastornos relacionados. Por último, la invención se refiere a kits, en particular kits de partes, que contienen la
 15 composición activa inmunoestimuladora y/o la vacuna.

De todos los tumores malignos, el 25% son carcinomas bronquiales (carcinoma pulmonar). En todo el mundo es la causa de muerte más común relacionada con cáncer en hombres y la segunda en mujeres. En Alemania es el tercer tipo de carcinoma más abundante después del cáncer de próstata y el carcinoma colorrectal. Es responsable de 1,3 millones de muertes anuales a nivel mundial. En
 20 Europa Central, la incidencia es de aproximadamente 60 por cada 100.000 habitantes y el número de personas a las que se les diagnostica de cáncer pulmonar aumenta de forma continua (actualmente en Alemania son alrededor de 50.000 al año). Cuyo se diagnostica de cáncer pulmonar, el índice de supervivencia general promedio de cinco años apenas alcanza un 5 por ciento. Sin embargo, la expectativa de vida de un solo paciente depende por completo de la etapa
 25 de la enfermedad (clasificación TMN) y del subtipo de carcinoma (cáncer pulmonar) encontrado (ver abajo).

Los subtipos principales de cáncer pulmonar catalogados por el tamaño y la apariencia de las células malignas identificadas bajo microscopio son cáncer pulmonar de células pequeñas (20%) y cáncer pulmonar de células no pequeñas (NSCLC) (80%). Esta clasificación, aunque se basa en criterios
 30 histológicos simples, tiene implicaciones muy importantes para la administración clínica y la prognosis de la enfermedad, tratándose el cáncer pulmonar de células pequeñas normalmente con quimioterapia, mientras que el cáncer pulmonar de células no pequeñas no microcítico principalmente se somete a cirugía como tratamiento de primera línea.

Los cánceres pulmonares de células no pequeñas (NSCPC) están agrupados debido a que su prognosis y manejo son casi idénticos. Existen tres subtipos principales: carcinoma pulmonar de células escamosas, adenocarcinoma y carcinoma pulmonar de células grandes. La cirugía es el pilar del tratamiento; sin embargo, únicamente un cuarto de los pacientes se someten a una resección exitosa, con un índice de recurrencia del 50%. Los enfoques terapéuticos en la enfermedad
 35 avanzada - tras la cirugía - involucran quimioterapia adyuvante y/o radioterapia adyuvante, mientras que la quimioterapia como monoterapia (terapia de primera línea) parece ser un intento relacionado con resultados relativamente deficientes. En una comparativa de cuatro regímenes de quimioterapia comúnmente utilizados, ninguno resultó superior. Los índices de respuesta variaron del 15% al 22%, con tasas de supervivencia de 1 año del 31% al 36% (véase por ejemplo O'Mahony, D., S. Kummar, et al. (2005). "Non-small-cell lung cancer vaccine therapy: a concise review" J Clin Oncol 23(35): 9022-
 40 8). Como resultado, aun cuyo la quimioterapia pre-operativa parece no prolongar la expectativa de vida, la quimioterapia adyuvante – también si se combina con radioterapia – mostró un aumento significativo en la expectativa de vida.

Uno de los enfoques quimioterapéuticos que se usan actualmente son combinaciones de sustancias basadas en platino con, por ejemplo, Gemcitabina incluso como terapia de primera línea, mientras
 50 que, por ejemplo, Pemetrexed se usa como tratamiento de segunda línea.

Otra opción que se usa para el tratamiento del NSCLC es la llamada "Terapia Dirigida", que pretende incrementar el éxito de la quimioterapia citotóxica clásica influenciando las estructuras diana específicas de los tumores a nivel molecular. Las sustancias que se utilizan incluyen Bevacizumab (un inhibidor de la angiogénesis) o Erlotinib, que se enfoca en las tirosina-cinasas del receptor del factor de crecimiento epidérmico (RFCE).

Aunque sin duda hay cierta mejora en las opciones terapéuticas actuales para el tratamiento del cáncer pulmonar, en especial NSCLC, sigue siendo una lucha en aumento –en vista de las altas tasas de mortalidad– con una fuerte necesidad de formas de tratamiento adicionales, alternativas o mejoradas. Por tanto, aquí se sugiere el uso del sistema inmune como un enfoque para el tratamiento del NSCLC. El sistema inmune desempeña un papel importante en el tratamiento y la prevención de numerosas enfermedades. De acuerdo con la etapa actual de conocimiento, los mamíferos proveen diversos mecanismos para proteger al organismo identificando y matando, por ejemplo, células tumorales. Estas células tumorales deben ser detectadas y distinguidas de las células y tejidos normales de los organismos.

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

El sistema inmune adaptativo es antígeno-específico y requiere el reconocimiento de antígenos "propios" o "no propios" específicos durante un proceso llamado presentación de antígenos. La especificidad antigénica permite generar respuestas que son creadas a medida de patógenos específicos o células infectadas por patógenos o células tumorales. La capacidad de incrementar estas respuestas a la medida se mantiene en el cuerpo mediante las llamadas "células de memoria". En caso de que un patógeno infecte el cuerpo más de una vez, se emplean las células de memoria específicas para eliminarlo rápidamente. Por tanto, el sistema inmune adaptativo permite una respuesta inmune más fuerte, así como una memoria inmunológica en la que cada patógeno o célula tumoral es "recordada" por uno o más antígenos de firma.

Los principales componentes del sistema inmune adaptativo en los vertebrados incluyen predominantemente linfocitos en el nivel celular y anticuerpos en el nivel molecular. Los linfocitos como componentes celulares del sistema inmune adaptativo incluyen células B y células T que se derivan de células madre hematopoyéticas de la médula ósea. Las células B están involucradas en la respuesta humoral, mientras que las células T están involucradas en la respuesta inmune mediada por células. Ambas células B y T portan moléculas receptoras que reconocen objetivos específicos. Las células T reconocen una diana "no propia", tal como una estructura diana patógena, una vez que los antígenos (por ejemplo, fragmentos pequeños de un patógeno) se han procesado y presentado en combinación con un receptor "propio", llamado molécula del complejo mayor de histocompatibilidad (MHC, por sus siglas en inglés). En contraste, el receptor específico de antígeno de célula B es una molécula de anticuerpo sobre la superficie de la célula B y reconoce patógenos cuyos anticuerpos sobre su superficie se unen a un antígeno extranjero específico. Este complejo antígeno/anticuerpo es absorbido por la célula B y procesado por proteólisis en péptidos. La célula B entonces despliega estos péptidos antigénicos sobre sus moléculas MHC clase II en su superficie. Esta combinación de MHC y antígeno atrae a una célula T auxiliar acopladora, la cual libera linfocinas y activa a la célula B. Conforme la célula B activada comienza a dividirse, su descendencia secreta millones de copias del anticuerpo que reconoce ese antígeno. Estos anticuerpos circulan en el plasma de la sangre y linfa, se unen a patógenos o células tumorales que expresan los antígenos y los marcan para su destrucción por activación de complemento o por absorción y destrucción por los fagocitos.

Como componente celular del sistema inmune adaptativo, las células T citotóxicas (CD8+) pueden formar una respuesta CTL. Las células T citotóxicas (CD8+) pueden reconocer los péptidos de los

patógenos endógenos y los autoantígenos unidos por las moléculas MHC tipo I. Las células CD8+ T desempeñan su función de eliminación liberando proteínas citotóxicas en la célula.

5 Los mecanismos del sistema inmune forman objetivos para los tratamientos curativos. Los métodos adecuados típicamente se basan en la administración de adyuvantes para provocar una respuesta inmune innata o en la administración de antígenos o inmunógenos con el fin de evocar una respuesta inmune adaptativa. Debido a que los antígenos típicamente se basan en componentes patogénicos específicos (por ejemplo proteínas de superficie) o fragmentos de los mismos, también se abarca la administración de ácidos nucleicos al paciente, seguida por la expresión de los polipéptidos, proteínas o antígenos deseados.

10 Hasta la fecha los métodos convenciones para provocar una respuesta inmune, inmunización o vacunación se basan en el uso de moléculas de ADN con el fin de incorporar la información genética requerida en la célula. Se han desarrollado diversos métodos para introducir ADN en las células, como transfección de fosfato de calcio, transfección de polipreno, fusión de protoplastos, electroporación, microinyección y lipofección, siendo la lipofección un método adecuado
 15 comprobado. Los virus ADN también pueden usarse como vehículo de ADN. Debido a sus propiedades infecciosas, dichos virus alcanzan una tasa de transfección muy elevada. Los virus que se usan están genéticamente modificados, de manera que no se forman partículas infecciosas funcionales en la célula transfectada. Sin embargo, a pesar de estas precauciones, no es posible descartar el riesgo de la propagación incontrolada del gen introducido y de genes virales, por ejemplo debido a posibles eventos de recombinación. Esto también conlleva el riesgo de que el ADN se inserte en un gen intacto del genoma de la célula huésped por, por ejemplo, recombinación, con la consecuencia de que este gen pueda mutarse y por tanto inactivarse completa o parcialmente o pueda dar pie a una pérdida de información. En otras palabras, la síntesis de un producto génico que es vital para la célula puede estar completamente contenida o alternativamente expresada en un producto génico incorrecto o modificado. Se produce un riesgo particular si el ADN se integra en un gen que está implicado en la regulación del crecimiento celular. En este caso, la célula huésped puede degenerarse y dar como resultado cáncer o formación tumoral. Además, si el ADN introducido en la célula debe expresarse, es necesario que el vehículo de ADN correspondiente contenga un promotor fuerte, tal como un promotor CMV viral. La integración de dichos promotores en el genoma
 20 de la célula tratada puede dar como resultado alteraciones no deseadas de la regulación de la expresión génica en la célula. Otro riesgo de usar ADN como agente para inducir una respuesta inmune (por ejemplo, como una vacuna) es la inducción de los anticuerpos anti-ADN patogénicos en el paciente al que se le ha introducido el ADN extranjero y provocar así una respuesta inmune (posiblemente fatal).

35 El documento EP 1 604 688 describe vacunas basadas en ARNm para el tratamiento de enfermedades tumorales. Los ARNm aplicados se caracterizan por un aumento del contenido G/C.

La WO 2006/008154 se refiere a mezclas de ARNm para la vacunación contra enfermedades tumorales.

40 La WO 2006/024518 se refiere a métodos específicos de estimular una respuesta inmune mediante la administración de un ARNm que contiene al menos un antígeno de un patógeno o de un antígeno tumoral, acompañada por la administración de otro componente seleccionado de citoquina, citoquina-ARNm, ARN adyuvante, de un ADN CpG o de un adyuvante ARN todos ellos actuando como un adyuvante.

45 Mientras que la EP 1 604 688 y la WO 2006/008154 se refieren a la estimulación de la respuesta inmune adaptativa, la WO 2004/004743 principalmente se refiere a la estimulación de la respuesta inmune innata mediante un ARN químicamente modificado. Estos agentes inmunoestimuladores puede combinarse con antígenos tumorales (evocando una respuesta inmune adaptativa) para proporcionar una vacuna.

50 Por tanto, en general, existe margen y necesidad de un sistema eficiente que pueda usarse para estimular de forma efectiva el sistema inmune con el fin de permitir el tratamiento del cáncer

pulmonar de células no pequeñas (NSCLC), al mismo tiempo que se evitan problemas de propagación no controlada de un gen introducido debido a composiciones basadas en ADN.

5 Así, un objetivo de la presente invención es proporcionar una composición que a) permita el tratamiento del cáncer pulmonar estimulando el sistema inmune, al mismo tiempo que b) evita las desventajas antes mencionadas.

Este objetivo se resuelve mediante el objeto de la presente invención, en particular mediante una composición activa inmunoestimuladora que comprende cinco ARN monocistrónicos, cada uno codificando un antígeno diferente seleccionado del grupo que comprende los antígenos:

- 10
- NY-ESO-1,
 - MAGE-C1,
 - MAGE-C2,
 - 5T4, y
 - Survivina,

15 donde el ARN que codifica NY-ESO-1 comprende una secuencia de ARN según la SEQ ID No 21 o tiene al menos una identidad del 80% con la SEQ ID No 21,

donde el ARN que codifica MAGE-C1 comprende una secuencia de ARN según la SEQ ID No 24 o tiene al menos una identidad del 80% con la SEQ ID No 24,

donde el ARN que codifica MAGE-C2 comprende una secuencia de ARN según la SEQ ID No 26 o tiene al menos una identidad del 80% con la SEQ ID No 26,

20 donde el ARN que codifica 5T4 comprende una secuencia de ARN según la SEQ ID No 4 o tiene al menos una identidad del 80% con la SEQ ID No 4,

donde el ARN que codifica Survivina comprende una secuencia de ARN según la SEQ ID No 19 o tiene al menos una identidad del 80% con la SEQ ID No 19,

25 donde el contenido de G/C de las regiones codificadoras de ARN está aumentado en comparación con el contenido en G/C de las regiones codificadoras de los ARN de tipo natural, no estando modificada la secuencia de aminoácidos codificada de dichos ARN en comparación con la secuencia de aminoácidos codificada de los ARN de tipo natural.

30 De forma sorprendente, se ha encontrado que una combinación específica de al menos estos cinco antígenos del grupo arriba mencionado, como contenidos en una composición activa inmunoestimuladora según la presente invención, es capaz de estimular efectivamente el sistema inmune (adaptativo) para permitir el tratamiento del cáncer pulmonar de células no pequeñas (NSCLC). En la presente, los términos antígenos, proteínas antigénicas o péptidos antigénicos pueden usarse indistintamente. En el contexto de la presente invención, una composición activa inmunoestimuladora según la presente invención se puede comprender aún mejor como una

35 composición que es capaz de provocar una respuesta inmune, preferiblemente una respuesta inmune adaptativa como se define aquí, debido a uno de los componentes contenidos o codificados por los componentes de la composición activa inmunoestimuladora, por los al menos cinco ARN, preferentemente ARNm, cada uno codificando un antígeno diferente, como se define en la reivindicación 1.

40 Uno de los ARN de la composición activa inmunoestimuladora codifica para 5T4. En el contexto de esta invención, "5T4" es glicoproteína trofoblastos. Las secuencias del ARN, preferiblemente del ARNm, que codifica para "5T4" se muestra en la Fig. 3 (SEQ ID NO: 3) y en la Fig. 4 (SEQ ID NO: 4). Harrop, Connolly et al. (2006) reportaron que el antígeno oncofetal de humano 5T4 es una glicoproteína de membrana rica en leucina 72-kDa que se expresa a niveles altos en la placenta y

45 también en una amplia gama de carcinomas de humano incluyendo cáncer colorrectal, gástrico, renal y ovárico, pero escasamente en tejidos normales (véase Harrop, R., N. Connolly, et al. (2006). "Vaccination of colorectal cancer patients with modified Vaccinia Ankara delivering the tumor antigen

5T4 (TroVax) induces immune responses which correlate with disease control: a phase I/II trial." Clin Cancer Res 12(1 Pt 1): 3416-24). La sobreexpresión de 5T4 se relaciona con una prognosis deficiente en pacientes con carcinoma colorrectal, gástrico y ovárico. A pesar de dichos factores de composición, las respuestas inmunes celulares específicas de 5T4 y/o humorales se indujeron en la mayoría de los pacientes (16 de 17; 94%) tras la inmunización de TroVax, que se consideró alentadora en comparación con muchos otros estudios de inmunoterapia para el cáncer. En resumen, mostraron seguridad e inmunogenicidad de TroVax suministrada vía rutas de administración i.m. e i.d. Zhao y Wang (2007) (Zhao, Y. y Y. Wang (2007). "5T4 oncotrophoblast glycoprotein: janus molecule in life y a novel potential target against tumors." Cell Mol Immunol 4(2): 99-104) reportó que la glicoproteína oncotrofoblasto 5T4 es una proteína transmembrana que se expresa en el tejido embrionario y diversas superficies de células tumorales malignas. Desempeña un papel vital en múltiples procesos biológicos y patológicos, incluyendo la migración celular masiva durante la embriogénesis, la invasión celular asociada con la implantación y la metástasis neoplásica en el avance de tumorigénesis. De acuerdo con Kopreski, Benko et al. (2001) 5T4 es una glicoproteína trofoblasto que frecuentemente se sobreexpresa en malignidades epiteliales que provee un objetivo potencial para los terapéuticos de cáncer (véase Kopreski, M. S., F. A. Benko, et al. (2001). "Circulating RNA as a tumor marker: detection of 5T4 ARNm in breast y lung cancer patient serum." Ann N Y Acad Sci 945: 172-8). Se colectó suero de 19 pacientes con cáncer de mama avanzado (5 pacientes) o cáncer pulmonar no microcítico (14 pacientes), y de 25 voluntarios de control normal control con un ARN amplificable. El ARN extraído del suero era RT-PCR amplificado usando reacciones de dos etapas heminested, con productos detectados por electroforesis en gel. Se detectó ARNm 5T4 reproduciblemente en el suero de 8/19 (42%) pacientes con cáncer, incluyendo el suero de 2/5 pacientes con cáncer de mama y el suero de 6/14 pacientes con cáncer pulmonar, pero únicamente en el suero de 3/25 (12%) del control normal (p = 0.035). De acuerdo con la invención, uno de los ARN de la composición activa inmunoestimuladora codifica así un antígeno 5T4 y puede comprender la secuencia que se muestra en la Fig. 4 (SEQ ID NO: 4). Según la invención, los ARN de la composición activa inmunoestimuladora pueden codificar alternativa o adicionalmente para un antígeno 5T4 seleccionado de un fragmento, una variante o un epítipo de una secuencia 5T4 codificada por el ácido nucleico mostrado en la Fig. 4 (SEQ ID NO: 4), compartiendo una identidad de secuencia de al menos un 80% con la SEQ ID NO: 4.

Uno de los ARN de la composición activa inmunoestimuladora codifica para NY-ESO-1. En el contexto de esta invención "NY-ESO-1" es antígeno 1B cáncer/testículos. La secuencia de ARN, preferiblemente del ARNm, que codifica para "NY-ESO-1" se muestra en la Fig. 20 (SEQ ID NO: 20) y en la Fig. 21 (SEQ ID NO: 21). Chen, Scanlan et al. (1997) reportaron que la expresión de ARNm de NY-ESO-1 en varios tumores humanos por RT-PCR encontrando Melanoma 23/67, cáncer ovárico 2/8, cáncer de mama 10/33, cáncer tiroideo 2/5, cáncer de próstata 4/16, cáncer de vejiga 4/5, cáncer de colon 0/16, linfoma Burkitt 1/2, Glioma 0/15, carcinoma de células basales 0/2, cáncer gástrico 0/12, Leiomiomasarcoma 0/2, cáncer pulmonar 2/12, otros sarcomas 0/2, cáncer renal 0/10, cáncer pancreático 0/2, linfoma 0/10, Seminoma 0/1, Hepatoma 2/7, Tumor de la espina dorsal 0/1 (véase Chen, Y. T., M. J. Scanlan, et al. (1997). "A testicular antigen aberrantly expressed in human cancers detected by autologous antibody screening." Proc Natl Acad Sci U S A 94(5): 1914- 8). Jager, Karbach et al. (2006) reportaron que NY-ESO-1 es un antígeno de cáncer/testículos expresado en un rango de malignidades humanas, y que se estaba desarrollando un número de estrategias de vacunas dirigidas a NY-ESO-1 (véase Jager, E., J. Karbach, et al. (2006). "Recombinant vaccinia/fowlpox NY-ESO-1 vaccines induce both humoral y celular NY-ESO-1 - specific immune responses in cancer patients." Proc Natl Acad Sci U S A 103(39): 14453-8). En el estudio presentado, la seguridad e inmunogenicidad de vacuna NY-ESO-1 recombinante y viruela aviar - NY-ESO-1 recombinante se analizaron en una serie de 36 pacientes con un rango de diferentes tipos de tumorales. Cada constructo se probó primero de forma individual a dos diferentes niveles de dosis y luego en un escenario de aplicación inicial-refuerzo con vacunas NY-ESO-1 recombinantes seguidos de viruela aviar- NY-ESO-1 recombinante. Las vacunas fueron bien toleradas ya sea de forma individual o en conjunto. Las respuestas a los anticuerpos NY-ESO-1 específicos y/o las respuestas de células CD8 y CD4 T específicos dirigidas a una amplia gama de epítopes NY-ESO-1 se indujeron mediante un curso de al menos cuatro vacunas a intervalos mensuales en una alta proporción de pacientes. Los clones de células CD8 T derivadas de cinco pacientes vacunados mostraron que lisaban células objetivo de melanoma que expresan NY-ESO-

1. En varios pacientes con melanoma, había una fuerte impresión de que el curso natural de la enfermedad estaba favorablemente influenciada por la vacunación. Davis, Chen et al. (2004) reportaron que los péptidos NY-ESO-1 H LA-A2 –restringidos inyectados de forma intradérmica eran seguros e inmunogénicos (Davis, I. D., W. Chen, et al. (2004). "Recombinant NY-ESO-1 protein with ISCOMATRIX adjuvant induces broad integrated antibody y CD4(+) y CD8(+) T cell responses in humans." Proc Natl Acad Sci U S A 101 (29): 10697-702). A pesar de que estos estudios se diseñaron únicamente para determinar la seguridad y la inmunogenicidad, algunos pacientes mostraron regresión tumoral o estabilización de la enfermedad. Además Jager, Gnjatic et al. (2000) expresaron que se observa una respuesta inmune amplia de NY-ESO-1 específica incluyendo anticuerpos y respuestas de células T CD4 y CD8 T tras la inmunización con proteína NY-ESO-1 recombinante con adyuvante ISCOMATRIX (CSL Ltd., Parkville, Victoria, Australia) en pacientes con melanoma que expresa NY-ESO-1 extirpado (véase Jager, E., S. Gnjatic, et al. (2000). "Induction of primary NY-ESO-1 immunity: CD8+ T lymphocyte y antibody responses in peptide-vaccinated patients with NY-ESO-1 + cancers." Proc Natl Acad Sci U S A 97(22): 12198-203). Esta respuesta inmune a la vacuna parecía estar asociada con la supervivencia libre de enfermedad. Además, Odunsi, Qian et al. (2007) reportó que la vacunación con un péptido NY-ESO-1 induce respuestas humorales integradas y de células T en cáncer ovárico (véase Odunsi, K., F. Qian, et al. (2007). "Vaccination with an NY-ESO-1 peptide of HLA class I/II specificities induces integrated humoral y T cell responses in ovarian cancer." Proc Natl Acad Sci U S A 104(31): 12837-42). Según la invención, un ARN comprendido en la composición activa inmunoestimuladora codifica así para un antígeno NY-ESO-1 y puede comprender la secuencia mostrada en la Fig. 21 (SEQ ID NO: 21). Según la invención, el ARN de la composición activa inmunoestimuladora puede codificar alternativa o adicionalmente para un antígeno NY-ESO-1 seleccionado de un fragmento, una variante o un epítipo de una secuencia NY-ESO-1 codificada por el ácido nucleico mostrado en la Fig. 21 (SEQ ID NO: 21), compartiendo al menos un 80% de identidad de secuencia con la SEQ ID NO: 21.

Uno de los ARN de la composición activa inmunoestimuladora codifica para Survivina. En el contexto de esta invención "Survivina" es una repetición baculoviral de IAP que contiene 5 (survivin). Las secuencias de ARN, preferiblemente ARNm, que codifican para la "survivina" se muestran en la Fig. 18 (SEQ ID NO: 18) y la Fig. 19 (SEQ ID NO: 19). Grube, Moritz et al. (2007) describieron la Survivina (véase Grube, M., S. Moritz, et al. (2007). "CD8+ T cells reactive to survivin antigen in patients with multiple myeloma." Clin Cancer Res 13(3): 1053-60). Survivina es un miembro de los inhibidores de la familia apoptótica y se sobreexpresan en diferentes tipos de malignidades. Las células T citotóxicas que reconocen los epítopos de survivina pueden provocarse *in vitro* y por la vacunación en pacientes con leucemia, cáncer de mama y melanoma. Se investigó si las células T CD8+ específicas de survivin ocurrían en pacientes con mieloma múltiple y las células T que reconocen el péptido survivin de unión a H LA-A2.1 se detectaron en 9 de 23 pacientes y en 1 de 21 voluntarios sanos. Las células T reactivas a survivina se identificaron como células T efectoras terminalmente diferenciadas (CD8+, CD45RA+, y CCR7-). La expresión positiva de survivina de las células de mieloma en especímenes de médula ósea se presentó en 7 de 11 pacientes. Survivina se expresa de forma elevada en la mayoría de células cancerígenas de humanos de origen epitelial y hematopoyético, y la sobreexpresión está relacionada con el avance del cáncer, una prognosis deficiente, resistencia y corta supervivencia del paciente. Duffy, O'Donovan (2007) describieron que la Survivina es una proteína 16,5 kDa sobreexpresada en la mayoría de las malignidades pero rara vez se detecta en tejidos diferenciados normales de adultos (véase Duffy, M. J., N. O'Donovan, et al. (2007). "Survivin: a promising tumor biomarker." Cancer Lett 249(1): 49- 60). Funcionalmente, se ha demostrado que la survivina inhibe la apoptosis, promueve la proliferación celular y aumenta la angiogénesis. Consistente con su papel en estos procesos, la survivina se describió como un componente clave en el avance del cáncer. Debido a la gran diferencia en la expresión entre el tejido normal y maligno y su rol causal en el avance del cáncer, la survivina está sometida actualmente a una investigación intensiva como un marcador tumoral potencial. Nuevos datos sugieren que la medición de survivina puede ayudar en el diagnóstico temprano del cáncer de vejiga, determinar la prognosis en múltiples tipos de cáncer y predecir la respuesta a diversas terapias anticáncer. Zeis, Siegel et al. (2003) demostraron que CTL específicos de survivina de humano generados por PBMC mediante la estimulación con células dendríticas autólogas transfectadas con ARN-survivina eran citotóxicos para una gama de líneas celulares malignas hemopoyéticas y células de tumores primarios aisladas de pacientes con leucemia mieloide aguda (véase Zeis, M., S. Siegel, et al. (2003).

"Generation of cytotoxic responses in mice y human individuals against hematological malignancies using survivin-RNA-transfected dendritic cells." *J Immunol* 170(11): 5391-7). También se demostró que la vacunación de ratones con células dendríticas transfectadas con survivina-ARN conduce a una resistencia de largo plazo al desafío por un linfoma que expresa survivina, demostrando el potencial de survivina como un agente de rechazo tumoral. Se proveyó evidencia para el uso de survivina como una estructura objetivo para las estrategias inmunoterapéuticas contra los neoplasmas hematológicos. Según la invención, uno de los ARN de la composición activa inmunoestimuladora codifica así para un antígeno de Survivina y puede comprender la secuencia que se muestra en la Fig. 19 (SEQ ID NO: 19). Según la invención, el ARN de la composición activa inmunoestimuladora puede codificar alternativa o adicionalmente para un antígeno Survivina seleccionado de un fragmento, una variante o un epítipo de una secuencia Survivina codificada por el ácido nucleico mostrado la Fig. 19 (SEQ ID NO: 19), compartiendo al menos una identidad de secuencia del 80% con la SEQ ID NO: 19.

Uno de los ARN de la composición activa inmunoestimuladora codifica para MAGE-C1. En el contexto de esta invención "MAGE-C1" es la familia C del antígeno de melanoma, 1. Las secuencias del ARN, preferiblemente ARNm, que codifican para "MAGE-C1" se muestran en la Fig. 22 (SEQ ID NO: 22) y en la Fig. 23 (SEQ ID NO: 23) y en la Fig. 24 (SEQ ID NO: 24). Lucas, De Smet et al. (1998) recientemente identificaron MAGE-C1 al realizar RDA (véase Lucas, S., C. De Smet, et al. (1998). "Identification of a new MAGE gene with tumor-specific expression by representational difference analysis." *Cancer Res* 58(4): 743-52). MAGE-C1 no se expresó en un panel de tejidos normales probados con excepción de testículos. Entre las muestras tumorales, MAGE-C1 se expresó frecuentemente en seminomas, melanomas, y carcinomas de vejiga. También se expresó en una fracción significativa de carcinomas de cabeza y cuello, carcinomas de mama, carcinomas pulmonares no microcíticos, adenocarcinomas de próstata y sarcomas. Jungbluth, Chen et al. (2002) describieron la expresión en cáncer de mama, cáncer ovárico, cáncer hepático, cáncer testicular, cáncer de vejiga, melanoma y cáncer pulmonar no microcítico (39%) (véase Jungbluth, A. A., Y. T. Chen, et al. (2002). "CT7 (MAGE-C1) antigen expression in normal and neoplastic tissues." *Int J Cancer* 99(6): 839-45). Gure, Chua et al. (2005) analizaron tumores de 523 pacientes con cáncer pulmonar no microcítico (NSCLC) para la expresión de antígenos de cáncer-testículos (véase Gure, A. O., R. Chua, et al. (2005). "Cancer-testis genes are coordinately expressed and are markers of poor outcome in non-small cell lung cancer." *Clin Cancer Res* 11 (22): 8055-62). MAGE-C1 se presentó en 18.8%. Scanlan, Altorki et al. (2000) además reportaron la expresión de antígenos CT en 33 cánceres pulmonares no microcíticos: MAGE-C1: 30% (véase Scanlan, M. J., N. K. Altorki, et al. (2000). "Expression of cancer-testis antigens in lung cancer: definition of bromodomain testis-specific gene (BRDT) as a new CT gene, CT9." *Cancer Lett* 150(2): 155-64). Según la invención, uno de los ARN de la composición activa inmunoestimuladora codifica así para un antígeno MAGE-C1 y puede comprender la secuencia mostrada en la Fig. 24 (SEQ ID NO: 24). Según la invención, el al menos un ARN de la composición activa inmunoestimuladora puede codificar alternativa o adicionalmente para un antígeno MAGE-C1 seleccionado de un fragmento, una variante o un epítipo de una secuencia MAGE-C1 codificada por el ácido nucleico mostrado en la Fig. 24 (SEQ ID NO: 24), compartiendo una identidad de secuencia de al menos un 80% con la SEQ ID NO: 24.

Uno de los ARN de la composición activa inmunoestimuladora codifica para MAGE-C2. En el contexto de esta invención "MAGE-C2" es la familia de antígeno de melanoma C2. Las secuencias de ARN, preferiblemente ARNm, que codifican para "MAGE-C2" se muestran en la Fig. 25 (SEQ ID NO: 25) y la Fig. 26 (SEQ ID NO: 26). Lucas, De Plaen et al. (2000) recientemente identificó MAGE-C2 al ejecutar RDA sobre una línea celular de melanoma (véase Lucas, S., E. De Plaen, et al. (2000). "MAGE-B5, MAGE- B6, MAGE-C2, y MAGE-C3: four new members of the MAGE family with tumor-specific expression." *Int J Cancer* 87(1): 55-60). MAGE-C2 no se expresó en un panel de tejidos normales probados con excepción de testículos. Entre las muestras tumorales, MAGE-C2 se expresó frecuentemente en seminomas, melanomas, y carcinomas de vejiga. También se expresó en una fracción significativa de carcinomas de cabeza y cuello, carcinomas de mama, carcinomas pulmonares no microcíticos y sarcomas. Scanlan, Altorki et al. (2000) reportaron la expresión de antígenos CT en 33 cánceres pulmonares no microcíticos: MAGE-C2: 30% (véase Scanlan, M. J., N. K. Altorki, et al. (2000). "Expression of cancer-testis antigens in lung cancer: definition of bromodomain testis-specific gene (BRDT) as a new CT gene, CT9." *Cancer Lett* 150(2): 155-64).

Según la invención, el ARN de la composición activa inmunoestimuladora codifica así para un antígeno MAGE-C2 y puede comprender la secuencia mostrada en la Fig. 26 (SEQ ID NO: 26). Según la invención, el ARN de la composición activa inmunoestimuladora puede codificar alternativa o adicionalmente para un antígeno MAGE-C2 seleccionado de un fragmento, una variante o un epítipo de una secuencia MAGE-C2 codificada por el ácido nucleico mostrado en la Fig. 26 (SEQ ID NO: 26), compartiendo una identidad de secuencia de al menos un 80% con la SEQ ID NO: 26.

Los ARN de la composición activa inmunoestimuladora pueden además codificar para hTERT. En el contexto de esta descripción "hTERT" es transcriptasa inversa telomerasa humana y la secuencia preferida del ARN, preferiblemente del ARNm, que codifica para "hTERT" – si se usa en la composición activa inmunoestimuladora de acuerdo con la invención – se muestra en la Fig. 7 (SEQ ID NO: 7) y todavía más preferiblemente en la Fig. 8 (SEQ ID NO: 8). Minev, Hipp et al. (2000) describió que la telomerasa es una enzima ribonucleoproteína que se ha vinculado a la transformación maligna en células humanas (Minev, B., J. Hipp, et al. (2000). "Cytotoxic T cell immunity against telomerase reverse transcriptase in humans." Proc Natl Acad Sci U S A 97(9): 4796-801). La actividad de la telomerasa aumenta en la vasta mayoría de los tumores humanos, haciendo de su producto génico la primera molécula común con todos los tumores humanos. La generación de péptidos de telomerasa endógenamente procesados a las moléculas MHC Clase I podrían dirigir linfocitos T citotóxicos (LTC) a tumores de diferentes orígenes. Por lo tanto, de acuerdo con ellos esto podría ofrecer un avance en la terapia de vacunación contra el cáncer siempre y cuando el LTC precursor que reconoce los péptidos de telomerasa en adultos normales y pacientes de cáncer puedan expandirse mediante la inmunización. Además demostraron que la mayoría de los individuos normales y pacientes con cáncer de próstata inmunizados *in vitro* contra dos péptidos HLA-A2.1 restringidos de la transcriptasa inversa telomerasa (hTERT) desarrollaron LTC específica de hTERT. Carpenter y Vonderheide (2006) (Carpenter, E. L. y R. H. Vonderheide (2006); "Telomerase-based immunotherapy of cancer." Expert Opin Biol Ther 6(10): 1031 -9) reportó que el avance de la clonación de la transcriptasa inversa telomerasa de humano (hTERT) en 1997 en los primeros estudios clínicos de hTERT como un objetivo de la inmunoterapia antitumoral había sido rápida. hTERT se sobreexpresa en la mayoría de los cánceres humanos al mismo tiempo que tiene expresión limitada en tejido de adulto normal. Desempeña un papel crítico en la oncogénesis y puede expresarse mediante las células de cepa cancerígena. Sin embargo, a pesar de ser un antígeno propio, hTERT es inmunogénico tanto *in vitro* como *in vivo*. Varios estudios de Fase I de inmunoterapia hTERT se han completado en pacientes con cáncer de mama, próstata, pulmonar y otros, y los resultados clínicos e inmunológicos son alentadores. La inmunoterapia indujo células T antitumorales, funcionales en pacientes en ausencia de toxicidad clínica. La oportunidad de vacunar individuos como una estrategia de inmunoprevención también puede comprenderse para terapias a base de hTERT. Nair, S. K. y Heiser et al. (2000) describieron la inducción de inmunidad TERT anti-murina en ratones vacunados con células dendríticas transducidas con ART de TERT murina (véase Nair, S. K., A. Heiser, et al. (2000). "Induction of cytotoxic T cell responses and tumor immunity against unrelated tumors using telomerase reverse transcriptase RNA transfected dendritic cells." Nat Med 6(9): 1011-7.). Según un aspecto preferente, los ARN de la composición activa inmunoestimuladora pueden entonces codificar un antígeno hTERT seleccionado de la secuencia mostrada en la Fig. 7 (SEQ ID NO: 7), y - muy preferiblemente, en la Fig. 8 (SEQ ID NO: 8). Según otro aspecto preferente, los ARN de la composición activa inmunoestimuladora pueden codificar alternativa o adicionalmente un antígeno hTERT seleccionado de un fragmento, variante o epítipo de una secuencia hTERT como se muestra en la Fig. 7 (SEQ ID NO: 7), y - muy preferiblemente, como se muestra en la Fig. 8 (SEQ ID NO: 8).

Los ARN de la composición activa inmunoestimuladora puede también codificar para WT1. En el contexto de esta descripción "WT1" es Wilms tumor 1 y la secuencia preferida del ARN, preferiblemente ARNm, que codifica para "WT1" – si se usa en la composición activa inmunoestimuladora de conformidad con la invención – se muestra en la Fig. 9 (SEQ ID NO: 9), muy preferiblemente en la Fig. 10 (SEQ ID NO: 10) y – todavía más preferiblemente – en la Fig. 11 (SEQ ID NO: 11). Oka, Y. A. y Tsuboi et al. (2004) encontraron que la proteína del tumor Wilm se sobreexpresa en cáncer pulmonar (véase Oka, Y., A. Tsuboi, et al. (2004). "Induction of WT1 (Wilms' tumor gene)-specific cytotoxic T lymphocytes by WT1 peptide vaccine and the resultant cancer regression." Proc Natl Acad Sci U S A 101 (38): 13885-90). Oka et al. (2004, supra) vacunaron a 10

pacientes con cáncer pulmonar con un péptido derivado de WT1. Pudieron mostrar que la respuesta clínica se correlaciona con la actividad de células T CD8+ anti-tumorales. El gen WT1 del tumor Wilms se sobreexpresa en leucemia y diversos tipos de tumores sólidos, y se demostró que la proteína WT1 era un antígeno objetivo atractivo para la inmunoterapia contra estas malignidades.

5 Oka et al. (2004, supra) reportaron el resultado de un estudio clínico de fase I de inmunoterapia a base de péptidos WT1 para pacientes con cáncer de mama o pulmonar, síndrome mielodisplásico o leucemia mieloide aguda. Doce de los veinte pacientes en los que se pudo evaluar la eficacia de la vacunación WT1 mostraron respuestas clínicas tales como la reducción en las células de blastos leucémicos o tamaños de tumores y/o marcadores tumorales. Se observó una clara correlación entre

10 un aumento en las frecuencias de linfocitos T citotóxicos específicos de WT1 después de la vacunación de WT1 y las respuestas clínicas. Por lo tanto se demostró que la vacuna WT1 podía inducir linfocitos T citotóxicos específicos de WT1 y dar como resultado la regresión del cáncer sin dañar los tejidos normales. Según un aspecto preferente, los ARN de la composición activa inmuoestimuladora puede entonces codificar para un antígeno WT1 seleccionado de la secuencia como se muestra en la Fig. 9 (SEQ ID NO: 9), y – muy preferiblemente, como se muestra en la Fig. 10 (SEQ ID NO: 10) y todavía más preferiblemente como se muestra en la Figura 11 (SEQ ID NO: 11). Según otro aspecto preferente, los ARN de la composición activa inmuoestimuladora pueden codificar alternativa o adicionalmente para un antígeno WT1 seleccionado de un fragmento, variante o epítipo de una secuencia WT1 como se muestra en la Fig. 9 (SEQ ID NO: 9), y – muy preferiblemente, como se muestra en la Fig. 10 (SEQ ID NO: 10) y todavía más preferiblemente como se muestra en la Figura 11 (SEQ ID NO: 11).

Los ARN de la composición activa inmuoestimuladora pueden también codificar para MAGE-A2. En el contexto de esta descripción, "MAGE-A2" es la familia A de antígenos de melanoma, 2B y la secuencia preferida del ARN, preferiblemente del mRNA, que codifica para "MAGE-A2" – si se usa

25 en la composición activa inmuoestimuladora de conformidad con la invención – se muestra en la Fig. 14 (SEQ ID NO: 14), y – aún más preferiblemente – en la Fig. 15 (SEQ ID NO: 15). Gillespie y Coleman (1999) (Gillespie, A. M. y R. E. Coleman (1999). "The potential of melanoma antigen expression in cancer therapy." *Cancer Treat Rev* 25(4): 219-27) reportaron expresión en cáncer de vejiga, cáncer de mama, cáncer colorrectal, cáncer gástrico, cáncer de cabeza y cuello, cáncer pulmonar, cáncer maxilar, melanoma, cáncer esofágico, osteosarcoma y cáncer ovárico. Según un aspecto preferente, los ARN de la composición activa inmuoestimuladora pueden entonces codificar para un antígeno MAGE-A2 seleccionado de la secuencia como se muestra en la Fig. 14 (SEQ ID NO: 14), y – muy preferiblemente, como se muestra en la Fig. 15 (SEQ ID NO: 15). Según otro aspecto preferente, los ARN de la composición activa inmuoestimuladora pueden codificar

30 alternativa o adicionalmente para un antígeno MAGE-A2 seleccionado de un fragmento, variante o epítipo de una secuencia MAGE-A2 como se muestra en la Fig. 14 (SEQ ID NO: 14), y – muy preferiblemente, como se muestra en la Fig. 15 (SEQ ID NO: 15).

Los ARN de la composición activa inmuoestimuladora pueden además codificar para MAGE-A3. En el contexto de esta descripción, "MAGE-A3" es la familia A de antígenos de melanoma, 3 y la secuencia preferida del ARN, preferiblemente del ARNm, que codifica para "MAGE-A3" – si se usa

40 en la composición activa (inmuoestimuladora) de conformidad con la invención – se muestra en la Fig. 16 (SEQ ID NO: 16), y – aún más preferiblemente – en la Fig. 17 (SEQ ID NO: 17). Gillespie y Coleman (1999) (Gillespie, A. M. y R. E. Coleman (1999). "The potential of melanoma antigen expression in cancer therapy." *Cancer Treat Rev* 25(4): 219-27) reportó expresión en cáncer de vejiga, cáncer de mama, cáncer colorrectal, cáncer gástrico, glioma, cáncer de cabeza y cuello, cáncer pulmonar, cáncer maxilar, melanoma neuroblastoma, cáncer esofágico y cáncer ovárico. Siemel, Varwark et al. (2004) describieron un estudio realizado para determinar el índice de expresión de MAGE-A3 en etapas tempranas del cáncer pulmonar no microcítico (NSCLC) (véase Siemel, W., C. Varwerk, et al. (2004). "Melanoma associated antigen (MAGE)-A3 expression in

45 Stages I y II non-small cell lung cancer: results of a multi-center study." *Eur J Cardiothorac Surg* 25(1): 131-4). Se colectaron muestras de tumores primarios de 204 pacientes con etapas clínicas operables de NSCLC I o II y se determinó la etapa patológica. Se analizó la expresión de MAGE-A3 de las muestras de tejido por detección de transcritos MAGE-A3 usando la reacción en cadena de la polimerasa inversa transcriptasa. Se observó la expresión de MAGE-A3 en 80 de los 204 (39.2%)

50 tumores primarios en etapas I-II examinados. Atanackovic, Altorki et al. (2004) describieron que

MAGE-A3 un antígeno asociado con tumores originalmente identificado en melanoma, también se encontró en tumores de pulmones de células no pequeñas (véase Atanackovic, D., N. K. Altorki, et al. (2004). "Vaccine-induced CD4+ T cell responses to MAGE-3 protein in lung cancer patients." *J Immunol* 172(5): 3289-96). En un estudio clínico nueve pacientes de NSCLC recibieron vacunas con la proteína; 3 desarrollaron respuestas a anticuerpos. Siete de 8 pacientes que recibieron MAGE-A3 combinado con ASO2B adyuvante generaron anticuerpos contra MAGE-A3. Varios de estos pacientes también desarrollaron respuestas de células T a la proteína. Según un aspecto preferente, los ARN de la composición activa inmunoestimuladora pueden codificar entonces un antígeno MAGE-A3 seleccionado de la secuencia mostrada en la Fig. 16 (SEQ ID NO: 16), y - muy preferiblemente, como se muestra en la Fig. 17 (SEQ ID NO: 17). Según otro aspecto preferente, los ARN de la composición activa inmunoestimuladora pueden codificar alternativa o adicionalmente para un antígeno MAGE-A3 que se selecciona de un fragmento, variante o epítipo de una secuencia MAGE-A3 como se muestra en la Fig. 16 (SEQ ID NO: 16), y - muy preferiblemente, como se muestra en la Fig. 17 (SEQ ID NO: 17).

Los ARN de la composición activa inmunoestimuladora pueden además codificar para MUC1. En el contexto de esta descripción, "MUC1" es mucin 1 y la secuencia preferida del ARN, preferiblemente del ARNm, que codifica para "MUC1" - si se usa en la composición activa inmunoestimuladora de conformidad con la invención - se muestra en la Fig. 1 (SEQ ID NO: 1), y - aún más preferiblemente - en la Fig. 2 (SEQ ID NO: 2). Las mucinas asociadas con cáncer son un objetivo potencial de la inmunoterapia. Se cree que estas moléculas promueven la metástasis al facilitar la adhesión de células malignas a la superficie de células endoteliales.

De acuerdo con Denda-Nagai y Irimura (2000) (Denda-Nagai, K. y T. Irimura (2000). "MUC1 in carcinoma-host interactions." *Glycoconj J* 17(7-9): 649-58) MUC-1 se sobreexpresa en 90% de todos los adenocarcinomas, incluyendo mama, pulmonar, páncreas, próstata, estómago, colon y ovarios. Kontani, Taguchi et al. (2001) encontraron que MUC-1 se expresa en 60% de los cánceres pulmonares (véase Kontani, K., O. Taguchi, et al. (2001). "Modulation of MUC1 mucin as an escape mechanism of breast cancer cells from autologous cytotoxic T-lymphocytes." *Br J Cancer* 84(9): 1258-64), mientras que Kontani, Taguchi et al. (2003) encontraron en un estudio que analizaba el uso de DCs pulsados con antígenos MUC1 para provocar inmunidad celular en cánceres MUC1 positivos, que clínicamente siete de nueve pacientes MUC-1 positivos respondieron al tratamiento con ya fuera una reducción en los niveles de marcadores tumorales o la desaparición de efusión pleural maligna (véase Kontani, K., O. Taguchi, et al. (2003). "Dendritic cell vaccine immunotherapy of cancer targeting MUC1 mucin." *Int J Mol Med* 12(4): 493-502). Tres de estos pacientes que respondieron tenían NSCLC. Palmer, Parker et al. (2001) reportaron que en el estudio clínico de fase I usó péptido MUC1 en NSCLC en etapa III/IV, se estableció la seguridad y tolerabilidad de este agente (véase Palmer, M., J. Parker, et al. (2001). "Phase I study of the BLP25 (MUC1 peptide) liposomal vaccine for active specific immunotherapy in stage IIIB/IV non-small-cell lung cancer." *Clin Lung Cancer* 3(1): 49-57; discusión 58). Cinco de 12 pacientes (42%) tuvieron respuestas inmunológicas, y 4 de 12 pacientes (33%) lograron una enfermedad estable. Wierecky, Mueller et al. (2006) además identificaron dos péptidos 9-mer novedosos con unión a HLA-A2 de TAA MUC1, que se sobreexpresaron en varias malignidades hematológicas y epiteliales (véase Wierecky, J., M. Mueller, et al. (2006). "Dendritic cell-based cancer immunotherapy targeting MUC-1." *Cancer Immunol Immunother* 55(1): 63-7). Las células T citotóxicas generadas tras la pulsación de DC con estos péptidos fueron capaces de inducir lisis de células tumorales que expresaban MUC1 en una forma específica a antígeno y restringida a HLA. En dos estudios clínicos, se demostró que la vacuna de pacientes con cáncer avanzado usó DCs pulsados con péptidos derivados de MUC1 fue bien tolerada sin efectos secundarios serios y fue capaz de inducir respuestas inmunológicas. De los 20 pacientes con carcinoma de células renales metastásicas, 6 pacientes mostraron regresión de metástasis con 3 respuestas objetivas (1 CR, 2 PR). Según un aspecto preferente, los ARN de la composición activa inmunoestimuladora pueden entonces codificar para un antígeno MUC1 seleccionado de la secuencia mostrada en la Fig. 1 (SEQ ID NO: 1), y - muy preferiblemente, como se muestra en la Fig. 2 (SEQ ID NO: 2). Según otro aspecto preferente, los ARN de la composición activa inmunoestimuladora pueden codificar alternativa o adicionalmente para un antígeno MUC1 que se selecciona de un fragmento, variante o epítipo de una secuencia MUC1 como se muestra en la Fig. 1 (SEQ ID NO: 1), y - muy preferiblemente, como se muestra en la Fig. 2 (SEQ ID NO: 2).

Los ARN de la composición activa inmunoestimuladora pueden además codificar para Her-2/neu. En el contexto de esta descripción "Her-2/neu" es homólogo 2 del oncogén viral de leucemia eritroblástica v-erb-b2 y la secuencia preferida del ARN, preferiblemente del ARNm, que codifica para "Her-2/neu" - si se usa en la composición activa (inmunoestimuladora) de conformidad con la invención – se muestra en la Fig. 5 (SEQ ID NO: 5), y - muy preferiblemente - en la Fig. 6 (SEQ ID NO: 6). De acuerdo con Baxevanis, Sotiropoulou et al. (2004) HER-2/neu (también conocido como HER2 o c-erb-B2) es un receptor de proteína 185-kDa con una actividad de tirosina cinasa y homología extensiva al receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGF) (véase Baxevanis, C. N., P. A. Sotiropoulou, et al. (2004). "Immunobiology of HER-2/neu oncoprotein y its potential application in cancer immunotherapy." *Cancer Immunol Immunother* 53(3): 166-75). HER-2/neu se expresa en muchos tumores epiteliales y se conoce se sobreexpresa en alrededor de 20-25% de todos los cánceres ováricos y mamarios, 35-45% de todos los adenocarcinomas pancreáticos, y hasta 90% de los carcinomas colorrectales. La sobreexpresión de HER- 2/neu representa un marcador de prognosis escasa. La sobreexpresión de Her-2 se ha observado en tumores malignos de mamas, ovarios, páncreas, colon, pulmón y otros tejidos. Her-2 se expresa normalmente a bajos niveles en una variedad de tejidos de humano (piel, epitelio del tracto digestivo, mama, ovarios, hepatocitos). Bernhard, Salazar (2002) reportó en su conclusión que resultados tempranos de estudios clínicos que inmunizaron activamente pacientes con cáncer contra HER-2/neu demostraron que la inmunidad podía generarse y que las respuestas inmunes persistieron durante un periodo de tiempo (véase Bernhard, H., Salazar L., et al. (2002). "Vaccination against the HER-2/neu oncogenic protein." *Endocr Relat Cancer* 9(1): 33-44). Estudios con vacunas actuales se enfocaron únicamente en el uso de vacunas a base de epítopes o péptidos, principalmente debido a la observación de que las estrategias de vacunas con péptidos podrían sortear la tolerancia neu específica en modelos de roedores. La siguiente generación de vacunas de conformidad con Bernhard et al. (2002, supra) posiblemente incluirán vacunas a base de proteínas, preparaciones de antígenos HER-2/neu cargadas en DC, y formulaciones a base de ácido nucleico. Fueron prometedores los estudios en modelos de roedores que exploran estas estrategias a un nivel preclínico. La expansión de células T específicas de HER- 2/neu *ex vivo* después de la inmunización activa o el cultivo *in vitro* con DC que expresa HER- 2/neu se consideró una opción terapéutica para tratar tumores de sobreexpresión de HER-2/neu en etapas avanzadas. Sotiriadou et al. (2006) encontraron que en humanos, aunque se habían detectado respuestas inmunológicas contra los péptidos usados para la vacunación, no se describieron respuestas clínicas (véase Baxevanis, C. N., N. N. Sotiriadou, et al. (2006). "Immunogenic HER-2/neu peptides as tumor vaccines." *Cancer Immunol Immunother* 55(1): 85-95). De acuerdo con Disis, Cooley et al. (2002) Her-2/neu es un miembro de la familia EGFR (véase Disis, M. L., T. A. Gooley, et al. (2002). "Generation of T- cell immunity to the HER-2/neu protein after active immunization with HER-2/neu peptide- based vaccines." *J Clin Oncol* 20(11): 2624-32). Con frecuencia se sobreexpresa en cánceres de mama, ovarios, próstata, colon y pulmón. En un estudio clínico de fase I, 38 pacientes (2 con NSCLC) fueron vacunados con un péptido Her-2/neu. 92% de los pacientes desarrollaron inmunidad de células T a Her-2/neu. Según un aspecto preferente, los ARN de la composición activa inmunoestimuladora pueden entonces codificar para un antígeno Her-2/neu seleccionado de la secuencia mostrada en la Fig. 5 (SEQ ID NO: 5), y - muy preferiblemente, como se muestra en la Fig. 6 (SEQ ID NO: 6). Según otro aspecto preferente, los ARN de la composición activa inmunoestimuladora pueden codificar alternativa o adicionalmente para un antígeno Her-2/neu que se selecciona de un fragmento, variante o epítope de una secuencia Her-2/neu como se muestra en la Fig. 5 (SEQ ID NO: 5), y – muy preferiblemente, como se muestra en la Fig. 6 (SEQ ID NO: 6).

Los ARN de la composición activa inmunoestimuladora pueden además codificar para CEA. En el contexto de esta descripción, "CEA" es un antígeno carcinoembrionario (CECAM5 = molécula de adhesión celular relacionado con un antígeno carcinoembrionario 5) y la secuencia preferida del ARN, preferiblemente del ARNm, que codifica para "CEA" - si se usa en la composición activa (inmunoestimuladora) de conformidad con la invención – se muestra en la Fig. 12 (SEQ ID NO: 12), y - muy preferiblemente - en la Fig. 13 (SEQ ID NO: 13). De acuerdo con Hammarstrom (1999) CEA es una glicoproteína onco-fetal 180 kDa que actúa como una molécula de adhesión, y se sobreexpresa en 70% de NSCLC (Hammarstrom, S. (1999). "The carcinoembryonic antigen (CEA) family: structures, suggested functions y expression in normal y malignant tissues." *Semin Cancer Biol* 9(2): 67-81). Berinstein (2002) reportó que CEA tiene muchas características atractivas como

objetivo para la vacunación activa contra el cáncer (Berinstein, N. L. (2002). "Carcinoembryonic antigen as a target for therapeutic anticancer vaccines: a review." *J Clin Oncol* 20(8): 2197-207). Tiene un patrón de expresión favorable y se expresa en más de 50% de todos los cánceres humanos. Puede desempeñar un papel en el propio proceso de tumorigénesis y, por tanto, su expresión puede seleccionarse y conservarse durante el avance del cáncer. Se ha documentado que CEA se procesa y presenta en diversas moléculas MHC clase I. Además, la tolerancia inmunológica a CEA no es absoluta. Hay información extensa que demuestra que las células T pueden reconocer, activar y lisar células cancerígenas que están expresando CEA. Se han evaluado diversos intentos de vacunación terapéutica usyo CEA como un antígeno objetivo. Se ha establecido la seguridad de estos intentos. Además, se han registrado estas respuestas humorales y/o celulares a CEA. Aunque en su mayoría los pacientes elegidos para estos estudios presentados por Berinstein (2002, supra) han tenido cáncer de colon metastásico refractario y muy avanzado, se ha documentado cierta evidencia de la actividad clínica, con estabilización de le enfermedad y respuestas incluso objetivas que ocurren en ciertos pacientes. Las células dendríticas pulsadas con un péptido de unión a CEA MHC clase I agonista (CAPI -6D) y los vectores basados en el virus de la viruela que incorporan CEA, con o sin moléculas co-estimuladoras, parecieron más dinámicos para activar las respuestas de células T CD8. Desafortunadamente, los trabajos con células dendríticas podían estar limitados por la dificultad logística de obtener preparaciones de células dendríticas específicas para pacientes. Se reportaron cuatro estudios fase I que utilizan el sistema de vector del virus de la viruela del canario para dirigirse a CEA.

Estos estudios demostraron que dichos intentos eran seguros, con toxicidades moderadas grado 1 y grado 2 limitadas principalmente al sitio de inyección. Además, los estudios mostraron que las respuestas de células T celulares específicas pueden activarse a CEA en la mayoría de los pacientes. Estas respuestas pueden incrementarse mediante la inclusión de la molécula co-estimuladora B7.1 en el vector o por la adición de GM-CSF recombinante en el sitio de inyección. A pesar de que no se reportaron respuestas clínicas objetivas, una parte significativa de los pacientes en estos estudios de fase I experimentaron una estabilización de la enfermedad. Se considera que las estrategias de vacunación para incrementar aún más la frecuencia de células T que reconocen CEA aumentan más la actividad clínica de estas vacunas. Estos son datos que sugieren que al menos algunas vacunas podrían ser más efectivas en estados de enfermedad mínima. Ueda, Itoh et al (2004) describieron un estudio en el que 18 pacientes con cáncer gastrointestinal metastásico o cáncer pulmonar fueron tratados con células dendríticas autólogas pulsadas con péptidos derivados de CEA (véase Ueda, Y., T. Itoh, et al. (2004). "Dendritic cell-based immunotherapy of cancer with carcinoembryonic antigen-derived, HLA-A24-restricted CTL epitope: Clinical outcomes of 18 patients with metastatic gastrointestinal or lung adenocarcinomas." *Int J Oncol* 24(4): 909-17). Las reacciones inmunes medidas por las pruebas en piel y ensayos de células T *in vitro* se observaron en la mayoría de los pacientes.

A pesar de que no se reportaron respuestas clínicas objetivas, algunos pacientes tuvieron una enfermedad estable mientras recibían esta inmunoterapia. Según un aspecto preferente, los ARN de la composición activa inmunoestimuladora pueden entonces codificar para un antígeno CEA seleccionado de la secuencia mostrada en la Fig. 12 (SEQ ID NO: 12), y - muy preferiblemente, como se muestra en la Fig. 13 (SEQ ID NO: 13). Según otro aspecto preferente, los ARN de la composición activa inmunoestimuladora pueden codificar alternativa o adicionalmente para un antígeno CEA que se selecciona de un fragmento, variante o epítope de una secuencia CEA como se muestra en la Fig. 12 (SEQ ID NO: 12), y - muy preferiblemente, como se muestra en la Fig. 13 (SEQ ID NO: 13).

Los antígenos, proteínas antigénicas o péptidos antigénicos como se definen arriba que pueden ser codificados por el ARN de la composición activa inmunoestimuladora pueden comprender fragmentos o variantes de esas secuencias. Dichos fragmentos o variantes pueden comprender típicamente una secuencia que tiene una identidad de secuencia con uno o más de los antígenos, proteínas antigénicas o péptidos antigénicos antes mencionados o secuencias o sus secuencias codificadoras de ácido nucleico de al menos un 80%, con especial preferencia de al menos un 85%, incluso más preferiblemente al menos un 90% y lo más preferiblemente al menos un 95% o incluso

un 97%, con la secuencia completa de tipo silvestre, ya sea nivel de ácido nucleico o de aminoácidos.

5 "Fragmentos" de antígenos, proteínas antigénicas, o péptidos antigénicos en el contexto de la presente descripción pueden comprender una secuencia de un antígeno, proteína antigénica o péptido antigénico como se definen arriba, que es, con respecto a su secuencia de aminoácidos (o su secuencia codificada de ácido nucleico), N-terminal, C-terminal y/o está intrasecuencialmente truncada en comparación con la secuencia de aminoácidos de la proteína original (nativa) (su secuencia codificada de ácido nucleico). Dicho truncamiento puede ocurrir ya sea a nivel del aminoácido o correspondientemente a nivel del ácido nucleico. Una identidad de secuencia con respecto a dicho fragmento como se define antes puede referirse preferiblemente a todo el antígeno, a la proteína antigénica o al péptido antigénico como se define arriba o a toda la secuencia de ácido nucleico (codificada) de dicho antígeno, proteína antigénica o péptido antigénico. Fragmentos de antígenos, proteínas antigénicas, o péptidos antigénicos en el contexto de la presente descripción pueden comprender una secuencia de un antígeno, proteína antigénica, o péptido antigénico como se definen arriba, que tiene una longitud de alrededor de 6 a aproximadamente 20 o incluso más aminoácidos, por ejemplo fragmentos como se procesan y presentan por las moléculas MHC de clase I, preferiblemente que tienen una longitud de alrededor de 8 a aproximadamente 10 aminoácidos, por ejemplo, 8, 9, o 10, (o incluso 6, 7, 11, o 12 aminoácidos), o fragmentos como se procesan y presentan por las moléculas MHC de clase II, preferiblemente que tienen una longitud de alrededor de 13 o más aminoácidos, por ejemplo, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20 o incluso más aminoácidos, en donde estos fragmentos se pueden seleccionar de cualquier parte de la secuencia de aminoácidos. Estos fragmentos son típicamente reconocidos por células T en la forma de un complejo que consiste en un fragmento de péptido y una molécula de MHC, esto es los fragmentos típicamente no son reconocidos en su forma nativa.

25 Los fragmentos de antígenos, proteínas antigénicas, o péptidos antigénicos como se definen aquí también pueden comprender epítopes de estos antígenos, proteínas antigénicas, o péptidos antigénicos. Los epítopes (también conocidos como "determinantes de antígenos") en el contexto de la presente descripción son típicamente fragmentos localizados en la superficie externa de antígenos (nativos) proteínas antigénicas, o péptidos antigénicos como se definen aquí, preferiblemente con entre 5 y 15 aminoácidos, muy preferiblemente de 5 a 12 aminoácidos, incluso más preferiblemente de 6 a 9 aminoácidos, que pueden ser reconocidos por los anticuerpos o receptores de células B, esto es en su forma nativa. Dichos epítopes de antígenos, proteínas antigénicas, o péptidos antigénicos pueden seleccionarse de cualquiera de las variantes aquí mencionadas de dichos antígenos, proteínas antigénicas, o péptidos antigénicos. En este contexto, los determinantes antigénicos pueden ser epítopes conformacionales o discontinuos que se componen de segmentos de los antígenos, proteínas antigénicas, o péptidos antigénicos como se definen aquí que son discontinuos en la secuencia de aminoácidos de los antígenos, proteínas antigénicas, o péptidos antigénicos como se definen aquí, pero se reúnen en la estructura tridimensional o continua o epítopes lineales que se componen de una cadena de polipéptidos individual.

Las "variantes" de antígenos, proteínas antigénicas, o péptidos antigénicos como se definen arriba pueden ser codificadas por los ARN de la composición activa inmunoestimuladora según la presente descripción, donde son intercambiados los ácidos nucleicos de al menos un ARN(m), que codifican para un antígeno, proteína antigénica, o péptido antigénico como se definen arriba. Por tanto, un antígeno, proteína antigénica o péptido antigénico puede generarse, teniendo una secuencia de aminoácidos que difiere de la secuencia original en una o más mutaciones, tal como uno o más aminoácidos sustituidos, insertados y/o eliminados. De preferencia, estos fragmentos y/o variantes tienen la misma función biológica o actividad específica en comparación con el antígeno nativo de longitud completa o la proteína antigénica, por ejemplo, su propiedad antigénica específica.

50 Los ARN de la composición activa inmunoestimuladora de conformidad con la presente descripción también pueden codificar para un antígeno o una proteína antigénica como se define arriba, donde la secuencia de aminoácidos codificada comprende sustitución(es) de aminoácidos conservadoras en comparación con su secuencia fisiológica. Las secuencias de aminoácidos codificadas, así como

sus secuencias de nucleótidos codificadas en particular, caen bajo las variantes del término como se define anteriormente. Las sustituciones donde los aminoácidos que se originan de la misma clase se intercambian entre sí se conocen como sustituciones conservadoras. En particular, éstos son aminoácidos que tienen cadenas laterales alifáticas, cadenas laterales de carga positiva o negativa, grupos aromáticos en las cadenas laterales o aminoácidos, cadenas laterales que pueden entrar en puentes de hidrógeno, por ejemplo, cadenas laterales que tienen una función de hidroxilo. Esto significa que, por ejemplo, un aminoácido que tiene una cadena lateral polar es reemplazado por otro aminoácido que tiene también una cadena lateral polar o, por ejemplo, un aminoácido caracterizado por una cadena lateral hidrófoba es sustituido por otro aminoácido que también tiene una cadena lateral hidrófoba (por ejemplo, serina (treonina) por treonina (serina) o leucina (isoleucina) por isoleucina (leucina)). Las inserciones y sustituciones son posibles, en particular, en aquellas posiciones que no causan una modificación a la estructura tridimensional o que no afectan la región de unión. Las modificaciones a una estructura tridimensional por inserción(es) o extracción(es) puede determinarse fácilmente, por ejemplo, usando un espectro de CD (espectro de dicroísmo circular) (Urry, 1985, Absorption, Circular Dichroism y ORD of Polypeptides, in: Modern Physical Methods in Biochemistry, Neuberger et al., (ed.), Elsevier, Amsterdam).

Además, las variantes de antígenos, proteínas antigénicas, o péptidos antigénicos como se definen arriba, que pueden codificarse por los ARN de la composición activa inmunoestimuladora de conformidad con la presente descripción, también pueden comprender aquellas secuencias donde los ácidos nucleicos de al menos un ARN(m) son intercambiadas de acuerdo con la degeneración del código genético, sin conducir a una alteración de la secuencia de aminoácido respectiva del antígeno, proteína antigénica, o péptido antigénico, esto es la secuencia de aminoácidos o al menos parte de la misma podría no diferir de la secuencia original en una o más mutaciones dentro del significado anterior.

Con el fin de determinar el porcentaje al que dos secuencias (secuencias de ácidos nucleicos, por ejemplo, secuencias de ARN o ARNm 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 como se definen en la presente con anterioridad) son idénticas, las secuencias se pueden alinear con el fin de compararse subsecuentemente entre sí. Por tanto, por ejemplo, se pueden insertar espacios en la secuencia de la primera secuencia y se puede comparar el componente en la posición correspondiente de la segunda secuencia. Si una posición en la primera secuencia está ocupada por el mismo componente que en una posición en la segunda secuencia, las dos secuencias son idénticas en esta posición. El porcentaje al que las dos secuencias son idénticas es función del número de posiciones idénticas dividido entre el número total de posiciones. El porcentaje en que dos secuencias son idénticas puede determinarse usyo un algoritmo matemático. Un ejemplo preferido, pero no limitativo de algoritmo matemático que puede usarse es el algoritmo de Karlin et al. (1993), PNAS USA, 90:5873-5877 o Altschul et al. (1997), Nucleic Acids Res., 25:3389-3402. Dicho algoritmo está integrado en el programa BLAST. Las secuencias que son idénticas a las secuencias de la presente invención en cierto grado pueden identificarse con este programa.

La composición activa inmunoestimuladora según la presente invención comprende, como se define arriba, al menos cinco ARN, cada uno codificando para un antígeno diferente seleccionado de cualquiera de los antígenos según la reivindicación 1, ya que, de conformidad con la invención, una combinación específica de al menos cinco antígenos diferentes según la reivindicación 1 es capaz de estimular de forma efectiva el sistema inmune (adaptativo) para permitir el tratamiento del cáncer pulmonar de células no pequeñas (NSCLC). Sin embargo, la presente invención también proporciona dichas composiciones activas inmunoestimuladoras que comprenden al menos cinco ARN que codifican cinco, seis, siete, ocho, nueve, diez, once o incluso doce antígenos diferentes seleccionados de cualquiera de los antígenos del grupo anterior, donde es posible y se abarca cualquier combinación de estos antígenos que al menos comprenda los cinco ARN según la reivindicación 1.

Según otro aspecto preferente, la presente descripción proporciona una composición activa inmunoestimuladora que comprende al menos cinco ARN, que codifican para al menos cinco antígenos diferentes:

- a) donde al menos cinco de estos antígenos se seleccionan entre:
- 5
- 5T4,
 - NY-ESO-1,
 - Survivina,
 - MAGE-C1, y
 - MAGE-C2,
- 10 como se define en la reivindicación 1 y
- b) donde el o los otros antígenos se selecciona de al menos un antígeno tal como se define aquí, seleccionándose el o los otros antígenos entre, por ejemplo,
- 15
- hTERT,
 - WT1,
 - MAGE-A2,
 - MAGE-A3,
 - MUC1,
 - Her-2/neu, y
 - CEA.
- 20 Según otro aspecto preferente de la presente descripción, el al menos un antígeno según b) se selecciona de los antígeno(s) como se definen en una de las siguientes combinaciones:
- 25
- hTERT y WT1; o
 - hTERT y MAGE-A2; o
 - hTERT y 5T4; o
 - hTERT y MAGE-A3; o
 - hTERT y MUC1; o
 - hTERT y Her-2/neu; o
 - hTERT y NY-ESO-1; o
 - hTERT y CEA; o
- 30
- hTERT y Survivina; o
 - hTERT y MAGE-C1; o
 - hTERT y MAGE-C2; o
 - WT1 y MAGE-A2; o
 - WT1 y 5T4; o
- 35
- WT1 y MAGE-A3; o
 - WT1 y MUC1; o
 - WT1 y Her-2/neu; o
 - WT1 y NY-ESO-1; o
 - WT1 y CEA; o
- 40
- WT1 y Survivina; o
 - WT1 y MAGE-C1; o
 - WT1 y MAGE-C2; o
 - MAGE-A2 y 5T4; o
 - MAGE-A2 y MAGE-A3; o
- 45
- MAGE-A2 y MUC1; o
 - MAGE-A2 y Her-2/neu; o
 - MAGE-A2 y NY-ESO-1; o
 - MAGE-A2 y CEA; o
 - MAGE-A2 y Survivina; o
- 50
- MAGE-A2 y MAGE-C1; o
 - MAGE-A2 y MAGE-C2; o
 - 5T4 y MAGE-A3; o
 - 5T4 y MUC1; o

- 5T4 y Her-2/neu; o
- 5T4 y NY-ESO-1; o
- 5T4 y CEA; o
- 5T4 y Survivina; o
- 5 • 5T4 y MAGE-C1; o
- 5T4 y MAGE-C2; o
- MAGE-A3 y MUC1; o
- MAGE-A3 y Her-2/neu; o
- MAGE-A3 y NY-ESO-1; o
- 10 • MAGE-A3 y CEA; o
- MAGE-A3 y Survivina; o
- MAGE-A3 y MAGE-C1
- MAGE-A3 y MAGE-C2
- MUC1 y Her-2/neu; o
- 15 • MUC1 y NY-ESO-1; o
- MUC1 y CEA; o
- MUC1 y Survivina; o
- MUC1 y MAGE-C1; o
- MUC1 y MAGE-C2; o
- 20 • HER-2/NEU y NY-ESO-1; o
- HER-2/NEU y CEA; o
- HER-2/NEU y Survivina; o
- HER-2/NEU y MAGE-C1; o
- HER-2/NEU y MAGE-C2; o
- 25 • NY-ESO-1 y CEA; o
- NY-ESO-1 y Survivina; o
- NY-ESO-1 y MAGE-C1; o
- NY-ESO-1 y MAGE-C2; o
- CEA y Survivina; o
- 30 • CEA y MAGE-C1; o
- CEA y MAGE-C2; o
- Survivina y MAGE-C1; o
- Survivina y MAGE-C2; o
- MAGE-C1 y MAGE-C2;
- 35 o
- hTERT, WT1 y MAGE-A2; o
- hTERT, WT1 y 5T4; o
- hTERT, WT1 y MAGE-A3; o
- hTERT, WT1 y MUC1; o
- 40 • hTERT, WT1 y Her-2/neu; o
- hTERT, WT1 y NY-ESO-1; o
- hTERT, WT1 y CEA; o
- hTERT, WT1 y Survivina; o
- hTERT, WT1 y MAGE-C1; o
- 45 • hTERT, WT1 y MAGE-C2; o
- WT1, MAGE-A2 y 5T4; o
- WT1, MAGE-A2 y MAGE-A3; o
- WT1, MAGE-A2 y MUC1; o
- WT1, MAGE-A2 y Her-2/neu; o
- 50 • WT1, MAGE-A2 y NY-ESO-1; o
- WT1, MAGE-A2 y CEA; o
- WT1, MAGE-A2 y Survivina; o
- WT1, MAGE-A2 y MAGE-C1; o

- WT1, MAGE-A2 y MAGE-C2; o
 - MAGE-A2, 5T4 y MAGE-A3; o
 - MAGE-A2, 5T4 y MUC1; o
 - MAGE-A2, 5T4 y Her-2/neu; o
 - 5 • MAGE-A2, 5T4 y NY-ESO-1; o
 - MAGE-A2, 5T4 y CEA; o
 - MAGE-A2, 5T4 y Survivina; o
 - MAGE-A2, 5T4 y MAGE-C1; o
 - MAGE-A2, 5T4 y MAGE-C2; o •
 - 10 • 5T4, MAGE-A3 y MUC1; o
 - 5T4, MAGE-A3 y Her-2/neu; o
 - 5T4, MAGE-A3 y NY-ESO-1; o
 - 5T4, MAGE-A3 y CEA; o
 - 5T4, MAGE-A3 y Survivina; o
 - 15 • 5T4, MAGE-A3 y MAGE-C1; o
 - 5T4, MAGE-A3 y MAGE-C2; o
 - MAGE-A3, MUC1 y Her-2/neu; o
 - MAGE-A3, MUC1 y NY-ESO-1; o
 - MAGE-A3, MUC1 y CEA; o
 - 20 • MAGE-A3, MUC1 y Survivina; o
 - MAGE-A3, MUC1 y MAGE-C1; o
 - MAGE-A3, MUC1 y MAGE-C2; o
 - MUC1, Her-2/neu y NY-ESO-1; o
 - MUC1, Her-2/neu y CEA; o
 - 25 • MUC1, Her-2/neu y Survivina; o
 - MUC1, Her-2/neu y MAGE-C1; o
 - MUC1, Her-2/neu y MAGE-C2; o
 - HER-2/NEU, NY-ESO-1 y CEA; o
 - HER-2/NEU, NY-ESO-1 y Survivina; o
 - 30 • HER-2/NEU, NY-ESO-1 y MAGE-C1; o
 - HER-2/NEU, NY-ESO-1 y MAGE-C2; o
 - NY-ESO-1, CEA y Survivina; o
 - NY-ESO-1, CEA y MAGE-C1; o
 - NY-ESO-1, CEA y MAGE-C2; o
 - 35 • CEA, Survivina y MAGE-C1; o
 - CEA, Survivina y MAGE-C2; o
 - Survivin, MAGE-C1 y MAGE-C2;
- o
- hTERT, WT1, MAGE-A2 y 5T4; o
 - 40 • hTERT, WT1, MAGE-A2 y MAGE-A3; o
 - hTERT, WT1, MAGE-A2 y MUC1; o
 - hTERT, WT1, MAGE-A2 y Her-2/neu; o
 - hTERT, WT1, MAGE-A2 y NY-ESO-1; o
 - hTERT, WT1, MAGE-A2 y CEA; o
 - 45 • hTERT, WT1, MAGE-A2 y Survivina; o
 - hTERT, WT1, MAGE-A2 y MAGE-C1; o
 - hTERT, WT1, MAGE-A2 y MAGE-C2; o
 - WT1, MAGE-A2, 5T4 y MAGE-A3; o
 - WT1, MAGE-A2, 5T4 y MUC1; o
 - 50 • WT1, MAGE-A2, 5T4 y Her-2/neu; o
 - WT1, MAGE-A2, 5T4 y NY-ESO-1; o
 - WT1, MAGE-A2, 5T4 y CEA; o
 - WT1, MAGE-A2, 5T4 y Survivina; o

- WT1, MAGE-A2, 5T4 y MAGE-C1; o
 - WT1, MAGE-A2, 5T4 y MAGE-C2; o
 - MAGE-A2, 5T4, MAGE-A3 y MUC1; o
 - MAGE-A2, 5T4, MAGE-A3 y Her-2/neu; o
 - 5 • MAGE-A2, 5T4, MAGE-A3 y NY-ESO-1; o
 - MAGE-A2, 5T4, MAGE-A3 y CEA; o •
 - MAGE-A2, 5T4, MAGE-A3 y Survivina; o
 - MAGE-A2, 5T4, MAGE-A3 y MAGE-C1; o
 - MAGE-A2, 5T4, MAGE-A3 y MAGE-C2; o
 - 10 • 5T4, MAGE-A3, MUC1, y Her-2/neu; o
 - 5T4, MAGE-A3, MUC1 y NY-ESO-1; o
 - 5T4, MAGE-A3, MUC1 y CEA; o
 - 5T4, MAGE-A3, MUC1 y Survivin; o
 - 5T4, MAGE-A3, MUC1 y MAGE-C1; o
 - 15 • 5T4, MAGE-A3, MUC1 y MAGE-C2; o
 - MAGE-A3, MUC1, Her-2/neu y NY-ESO-1; o
 - MAGE-A3, MUC1, Her-2/neu y CEA; o
 - MAGE-A3, MUC1, Her-2/neu y Survivina; o
 - MAGE-A3, MUC1, Her-2/neu y MAGE-C1; o
 - 20 • MAGE-A3, MUC1, Her-2/neu y MAGE-C2; o
 - MUC1, Her-2/neu, NY-ESO-1 y CEA; o
 - MUC1, Her-2/neu, NY-ESO-1 y Survivina; o
 - MUC1, Her-2/neu, NY-ESO-1 y MAGE-C1; o
 - MUC1, Her-2/neu, NY-ESO-1 y MAGE-C2; o
 - 25 • HER-2/NEU, NY-ESO-1, CEA y Survivina; o
 - HER-2/NEU, NY-ESO-1, CEA y MAGE-C1; o
 - HER-2/NEU, NY-ESO-1, CEA y MAGE-C2; o
 - NY-ESO-1, CEA, Survivina y MAGE-C1; o
 - NY-ESO-1, CEA, Survivina y MAGE-C2; o
 - 30 • CEA, Survivina, MAGE-C1 y MAGE-C2;
- o
- hTERT, WT1, MAGE-A2, 5T4 y MAGE-A3; o
 - hTERT, WT1, MAGE-A2, 5T4 y MUC1; o
 - hTERT, WT1, MAGE-A2, 5T4 y Her-2/neu; o
 - 35 • hTERT, WT1, MAGE-A2, 5T4 y NY-ESO-1; o
 - hTERT, WT1, MAGE-A2, 5T4 y CEA; o
 - hTERT, WT1, MAGE-A2, 5T4 y Survivina; o
 - hTERT, WT1, MAGE-A2, 5T4 y MAGE-C1; o
 - hTERT, WT1, MAGE-A2, 5T4 y MAGE-C2; o
 - 40 • WT1, MAGE-A2, 5T4, MAGE-A3 y MUC1; o
 - WT1, MAGE-A2, 5T4, MAGE-A3 y Her-2/neu; o
 - WT1, MAGE-A2, 5T4, MAGE-A3 y NY-ESO-1; o
 - WT1, MAGE-A2, 5T4, MAGE-A3 y CEA; o
 - WT1, MAGE-A2, 5T4, MAGE-A3 y Survivina; o
 - 45 • WT1, MAGE-A2, 5T4, MAGE-A3 y MAGE-C1; o
 - WT1, MAGE-A2, 5T4, MAGE-A3 y MAGE-C2; o
 - MAGE-A2, 5T4, MAGE-A3, MUC1 y Her-2/neu; o
 - MAGE-A2, 5T4, MAGE-A3, MUC1 y NY-ESO-1; o
 - MAGE-A2, 5T4, MAGE-A3, MUC1 y CEA; o
 - 50 • MAGE-A2, 5T4, MAGE-A3, MUC1 y Survivina; o
 - MAGE-A2, 5T4, MAGE-A3, MUC1 y MAGE-C1; o
 - MAGE-A2, 5T4, MAGE-A3, MUC1 y MAGE-C2; o
 - 5T4, MAGE-A3, MUC1, Her-2/neu y NY-ESO-1; o

- 5T4, MAGE-A3, MUC1, Her-2/neu y CEA; o
- 5T4, MAGE-A3, MUC1, Her-2/neu y Survivina; o
- 5T4, MAGE-A3, MUC1, Her-2/neu y MAGE-C1; o
- 5T4, MAGE-A3, MUC1, Her-2/neu y MAGE-C2; o
- 5 • MAGE-A3, MUC1, Her-2/neu, NY-ESO-1 y CEA; o
- MAGE-A3, MUC1, Her-2/neu, NY-ESO-1 y Survivina; o
- MAGE-A3, MUC1, Her-2/neu, NY-ESO-1 y MAGE-C1; o
- MAGE-A3, MUC1, Her-2/neu, NY-ESO-1 y MAGE-C2; o
- 10 • MUC1, Her-2/neu, NY-ESO-1, CEA y Survivina; o
- MUC1, Her-2/neu, NY-ESO-1, CEA y MAGE-C1; o
- MUC1, Her-2/neu, NY-ESO-1, CEA y MAGE-C2; o
- HER-2/NEU, NY-ESO-1, CEA, Survivina y MAGE-C1; o
- HER-2/NEU, NY-ESO-1, CEA, Survivina y MAGE-C2; o
- NY-ESO-1, CEA, Survivina, MAGE-C1 y MAGE-C2;
- 15 o
- hTERT, WT1, MAGE-A2, 5T4, MAGE-A3 y MUC1; o
- hTERT, WT1, MAGE-A2, 5T4, MAGE-A3 y Her-2/neu; o
- hTERT, WT1, MAGE-A2, 5T4, MAGE-A3 y NY-ESO-1; o
- hTERT, WT1, MAGE-A2, 5T4, MAGE-A3 y CEA; o
- 20 • hTERT, WT1, MAGE-A2, 5T4, MAGE-A3 y Survivina; o
- hTERT, WT1, MAGE-A2, 5T4, MAGE-A3 y MAGE-C1; o
- hTERT, WT1, MAGE-A2, 5T4, MAGE-A3 y MAGE-C2; o
- WT1, MAGE-A2, 5T4, MAGE-A3, MUC1 y Her-2/neu; o
- WT1, MAGE-A2, 5T4, MAGE-A3, MUC1 y NY-ESO-1; o
- 25 • WT1, MAGE-A2, 5T4, MAGE-A3, MUC1 y CEA; o
- WT1, MAGE-A2, 5T4, MAGE-A3, MUC1 y Survivina; o
- WT1, MAGE-A2, 5T4, MAGE-A3, MUC1 y MAGE-C1; o
- WT1, MAGE-A2, 5T4, MAGE-A3, MUC1 y MAGE-C2; o
- MAGE-A2, 5T4, MAGE-A3, MUC1, Her-2/neu y NY-ESO-1; o
- 30 • MAGE-A2, 5T4, MAGE-A3, MUC1, Her-2/neu y CEA; o
- MAGE-A2, 5T4, MAGE-A3, MUC1, Her-2/neu y Survivina; o
- MAGE-A2, 5T4, MAGE-A3, MUC1, Her-2/neu y MAGE-C1; o
- MAGE-A2, 5T4, MAGE-A3, MUC1, Her-2/neu y MAGE-C2; o
- 5T4, MAGE-A3, MUC1, Her-2/neu, NY-ESO-1 y CEA; o
- 35 • 5T4, MAGE-A3, MUC1, Her-2/neu, NY-ESO-1 y Survivina; o
- 5T4, MAGE-A3, MUC1, Her-2/neu, NY-ESO-1 y MAGE-C1; o
- 5T4, MAGE-A3, MUC1, Her-2/neu, NY-ESO-1 y MAGE-C2; o
- MAGE-A3, MUC1, Her-2/neu, NY-ESO-1, CEA y Survivina; o
- MAGE-A3, MUC1, Her-2/neu, NY-ESO-1, CEA y MAGE-C1; o
- 40 • MAGE-A3, MUC1, Her-2/neu, NY-ESO-1, CEA y MAGE-C2; o
- MUC1, Her-2/neu, NY-ESO-1, CEA, Survivina y MAGE-C1; o
- MUC1, Her-2/neu, NY-ESO-1, CEA, Survivina y MAGE-C2; o
- HER-2/NEU, NY-ESO-1, CEA, Survivina, MAGE-C1 y MAGE-C2;
- o
- 45 • hTERT, WT1, MAGE-A2, 5T4, MAGE-A3, MUC1 y Her-2/neu; o
- hTERT, WT1, MAGE-A2, 5T4, MAGE-A3, MUC1 y NY-ESO-1; o
- hTERT, WT1, MAGE-A2, 5T4, MAGE-A3, MUC1 y CEA; o
- hTERT, WT1, MAGE-A2, 5T4, MAGE-A3, MUC1 y Survivina; o
- hTERT, WT1, MAGE-A2, 5T4, MAGE-A3, MUC1 y MAGE-C1; o
- 50 • hTERT, WT1, MAGE-A2, 5T4, MAGE-A3, MUC1 y MAGE-C2; o
- WT1, MAGE-A2, 5T4, MAGE-A3, MUC1, Her-2/neu y NY-ESO-1; o
- WT1, MAGE-A2, 5T4, MAGE-A3, MUC1, Her-2/neu y CEA; o

- WT1, MAGE-A2, 5T4, MAGE-A3, MUC1, Her-2/neu y Survivina; o
 - WT1, MAGE-A2, 5T4, MAGE-A3, MUC1, Her-2/neu y MAGE-C1; o
 - WT1, MAGE-A2, 5T4, MAGE-A3, MUC1, Her-2/neu y MAGE-C2; o
 - MAGE-A2, 5T4, MAGE-A3, MUC1, Her-2/neu, NY-ESO-1 y CEA; o
 - 5 • MAGE-A2, 5T4, MAGE-A3, MUC1, Her-2/neu, NY-ESO-1 y Survivina; o
 - MAGE-A2, 5T4, MAGE-A3, MUC1, Her-2/neu, NY-ESO-1 y MAGE-C1; o
 - MAGE-A2, 5T4, MAGE-A3, MUC1, Her-2/neu, NY-ESO-1 y MAGE-C2; o
 - 5T4, MAGE-A3, MUC1, Her-2/neu, NY-ESO-1, CEA y Survivina; o
 - 5T4, MAGE-A3, MUC1, Her-2/neu, NY-ESO-1, CEA y MAGE-C1; o
 - 10 • 5T4, MAGE-A3, MUC1, Her-2/neu, NY-ESO-1, CEA y MAGE-C2; o
 - MAGE-A3, MUC1, Her-2/neu, NY-ESO-1, CEA, Survivina y MAGE-C1; o
 - MAGE-A3, MUC1, Her-2/neu, NY-ESO-1, CEA, Survivina y MAGE-C2; o
 - MUC1, Her-2/neu, NY-ESO-1, CEA, Survivina, MAGE-C1 y MAGE-C2;
- o
- 15 •
 - hTERT, WT1, MAGE-A2, 5T4, MAGE-A3, MUC1, Her-2/neu y NY-ESO-1; o
 - hTERT, WT1, MAGE-A2, 5T4, MAGE-A3, MUC1, Her-2/neu y CEA; o
 - hTERT, WT1, MAGE-A2, 5T4, MAGE-A3, MUC1, Her-2/neu y Survivina; o
 - hTERT, WT1, MAGE-A2, 5T4, MAGE-A3, MUC1, Her-2/neu y MAGE-C1; o
 - 20 • hTERT, WT1, MAGE-A2, 5T4, MAGE-A3, MUC1, Her-2/neu y MAGE-C2; o
 - WT1, MAGE-A2, 5T4, MAGE-A3, MUC1, Her-2/neu, NY-ESO-1 y CEA; o
 - WT1, MAGE-A2, 5T4, MAGE-A3, MUC1, Her-2/neu, NY-ESO-1 y Survivina; o
 - WT1, MAGE-A2, 5T4, MAGE-A3, MUC1, Her-2/neu, NY-ESO-1 y MAGE-C1; o
 - WT1, MAGE-A2, 5T4, MAGE-A3, MUC1, Her-2/neu, NY-ESO-1 y MAGE-C2; o
 - 25 • MAGE-A2, 5T4, MAGE-A3, MUC1, Her-2/neu, NY-ESO-1, CEA y Survivina; o
 - MAGE-A2, 5T4, MAGE-A3, MUC1, Her-2/neu, NY-ESO-1, CEA y MAGE-C1; o
 - MAGE-A2, 5T4, MAGE-A3, MUC1, Her-2/neu, NY-ESO-1, CEA y MAGE-C2; o
 - 5T4, MAGE-A3, MUC1, Her-2/neu, NY-ESO-1, CEA, Survivina y MAGE-C1; o
 - 5T4, MAGE-A3, MUC1, Her-2/neu, NY-ESO-1, CEA, Survivina y MAGE-C2; o
 - 30 • MAGE-A3, MUC1, Her-2/neu, NY-ESO-1, CEA, Survivina, MAGE-C1 y MAGE-C2;
- o
- hTERT, WT1, MAGE-A2, 5T4, MAGE-A3, MUC1, Her-2/neu, NY-ESO-1 y CEA; o
 - hTERT, WT1, MAGE-A2, 5T4, MAGE-A3, MUC1, Her-2/neu, NY-ESO-1 y Survivina; o
 - hTERT, WT1, MAGE-A2, 5T4, MAGE-A3, MUC1, Her-2/neu, NY-ESO-1 y MAGE-C1; o
 - 35 • hTERT, WT1, MAGE-A2, 5T4, MAGE-A3, MUC1, Her-2/neu, NY-ESO-1 y MAGE-C2; o
 - WT1, MAGE-A2, 5T4, MAGE-A3, MUC1, Her-2/neu, NY-ESO-1, CEA y Survivina; o
 - WT1, MAGE-A2, 5T4, MAGE-A3, MUC1, Her-2/neu, NY-ESO-1, CEA y MAGE-C1; o
 - WT1, MAGE-A2, 5T4, MAGE-A3, MUC1, Her-2/neu, NY-ESO-1, CEA y MAGE-C2; o
 - MAGE-A2, 5T4, MAGE-A3, MUC1, Her-2/neu, NY-ESO-1, CEA, Survivina y MAGE-C1; o
 - 40 • MAGE-A2, 5T4, MAGE-A3, MUC1, Her-2/neu, NY-ESO-1, CEA, Survivina y MAGE-C2; o
 - 5T4, MAGE-A3, MUC1, Her-2/neu, NY-ESO-1, CEA, Survivina, MAGE-C1 y MAGE-C2;
- o
- hTERT, WT1, MAGE-A2, 5T4, MAGE-A3, MUC1, Her-2/neu, NY-ESO-1, CEA y Survivina; o
 - hTERT, WT1, MAGE-A2, 5T4, MAGE-A3, MUC1, Her-2/neu, NY-ESO-1, CEA y MAGE-C1; o
 - 45 • hTERT, WT1, MAGE-A2, 5T4, MAGE-A3, MUC1, Her-2/neu, NY-ESO-1, CEA y MAGE-C2; o
 - WT1, MAGE-A2, 5T4, MAGE-A3, MUC1, Her-2/neu, NY-ESO-1, CEA, Survivina y MAGE-C1; o
 - WT1, MAGE-A2, 5T4, MAGE-A3, MUC1, Her-2/neu, NY-ESO-1, CEA, Survivina y MAGE-C2; o
 - MAGE-A2, 5T4, MAGE-A3, MUC1, Her-2/neu, NY-ESO-1, CEA, Survivina, MAGE-C1 y MAGE-C2;
- 50 o

- hTERT, WT1, MAGE-A2, 5T4, MAGE-A3, MUC1, Her-2/neu, NY-ESO-1, CEA, Survivina y MAGE-C1; o
 - hTERT, WT1, MAGE-A2, 5T4, MAGE-A3, MUC1, Her-2/neu, NY-ESO-1, CEA, Survivina y MAGE-C2; o
 - 5 • WT1, MAGE-A2, 5T4, MAGE-A3, MUC1, Her-2/neu, NY-ESO-1, CEA, Survivina, MAGE-C1 y MAGE-C2;
- o
- hTERT, WT1, MAGE-A2, 5T4, MAGE-A3, MUC1, Her-2/neu, NY-ESO-1, CEA, Survivina, MAGE-C1 y MAGE-C2.

10 Los ARN de la composición activa inmunoestimuladora de conformidad con la presente invención son típicamente cualquier ARN, preferiblemente, sin limitarse a, un ARN codificador, un ARN circular o lineal, un ARN de cadena simple o individual (que también puede referirse como un ARN debido a una asociación no covalente de dos ARN de una cadena) o un ARN de cadena parcialmente doble o un ARN de cadena parcialmente individual, que al menos son parcialmente autocomplementarios

15 (ambas de estas moléculas de ARN de cadena parcialmente doble o de cadena parcialmente individual típicamente están formadas por una molécula de ARN de cadena doble más larga y una más corta o por dos moléculas de ARN de cadena individual, que tienen aproximadamente la misma longitud, donde una molécula de ARN de una sola cadena es en parte complementaria con la otra molécula de ARN de cadena individual y así ambas forman un ARN de cadena doble en esta región,

20 es decir un ARN de cadena parcialmente doble o un ARN de cadena parcialmente individual con respecto a toda la secuencia de ARN). Muy preferiblemente, los ARN de la composición activa inmunoestimuladora de conformidad con la presente invención son ARN monohebra, todavía con más preferencia un ARN lineal. Todavía más preferiblemente, los ARN de la composición activa inmunoestimuladora de conformidad con la presente invención son ARN mensajero (ARNm). En

25 este contexto, un ARN mensajero (ARNm) es típicamente un ARN que se compone de (al menos) varios elementos estructurales, por ejemplo una región 5'-UTR opcional, un sitio de unión ribosómico dispuesto en el extremo 5' de una región codificadora, una región 3'-UTR opcional, que puede estar seguida de una cola poli-A (y/o a cola poli-C).

30 Cada uno de los cinco antígenos diferentes de la composición activa inmunoestimuladora de la presente invención están codificados por un ARN monocistrónico, preferiblemente un ARNm monocistrónico. En otras palabras, la composición activa inmunoestimuladora de la presente invención contiene al menos cinco ARN monocistrónicos, preferiblemente ARNm, donde cada uno de estos ARN monocistrónicos, preferiblemente ARNm, codifican un solo antígeno diferente, seleccionado del grupo según la reivindicación 1 y, preferiblemente, otros de los antígenos

35 adicionales que se describen aquí, preferentemente en una de las combinaciones antes mencionadas.

De acuerdo con otro aspecto particularmente preferido, la composición activa inmunoestimuladora puede comprender (al menos) un ARN bi- o incluso multicistrónico, preferiblemente ARNm, es decir (al menos) un ARN que porta dos o incluso más de las secuencias codificadoras de los al menos

40 cinco antígenos diferentes, seleccionados del grupo de otros antígenos adicionales como se describen aquí, preferiblemente en una de las combinaciones mencionadas. Dichas secuencias codificadoras de los al menos cinco antígenos (preferiblemente diferentes) de los (al menos) un ARN bi- o incluso multicistrónico pueden estar separadas por al menos una secuencia IRES (sitio de entrada ribosómico interno), como se define más adelante. Así, el término "que codifica para al menos dos antígenos (preferiblemente diferentes)" puede significar, sin limitarse a, que el (al menos) un ARN (bi- o incluso multicistrónico), preferiblemente ARNm, puede codificar para, por ejemplo, al menos dos, tres, cuatro, cinco, seis, siete, ocho, nueve, diez, once o doce antígenos (preferiblemente diferentes) del o los grupos antes mencionados de antígenos o sus fragmentos o variantes dentro de las definiciones anteriores. Más preferiblemente, sin limitarse a, el (al menos)

45 un ARN (bi- o incluso multicistrónico), preferiblemente ARNm, puede codificar para, por ejemplo, al menos dos, tres, cuatro, cinco o seis antígenos (preferiblemente diferentes) de los subgrupos antes mencionados de antígenos o sus fragmentos o variantes dentro de las definiciones anteriores. En este contexto, la llamada secuencia IRES (sitio de entrada ribosómico interno) como se define arriba

5 puede funcionar como un sitio de unión ribosómico único, pero también puede servir para proveer un ARN bi- o incluso multicistrónico como se define arriba que codifica para varias proteínas, que se traducirán por los ribosomas independientemente entre sí. Ejemplos de estas secuencias IRES que pueden emplearse según la invención son aquellas de picornavirus (por ejemplo, FMDV), pestivirus (CFFV), poliovirus (PV), virus de la encefalomiocarditis (ECMV), virus de enfermedades en pies y boca (FMDV), virus de hepatitis C (HCV), virus de la peste porcina clásica (CSFV), virus de leucoma de ratón (MLV), virus de inmunodeficiencia en simios (SIV) o virus de la parálisis del grillo (CrPV).

10 De acuerdo con otro aspecto particularmente preferido, la composición activa inmunoestimuladora de la presente invención puede comprender una mezcla de ARN monocistrónicos, preferiblemente ARNm, como se define con anterioridad, y al menos un ARN bi- o incluso multicistrónico, preferiblemente ARNm, como se define con anterioridad. El ARN monocistrónico y/o el al menos un ARN bi- o incluso multicistrónico preferiblemente codifican para diferentes antígenos o sus fragmentos o variantes dentro de las definiciones anteriores. Sin embargo, los ARN monocistrónicos como se definen en la reivindicación 1 y los ARN bi- o incluso multicistrónicos preferentemente también pueden codificar (en parte) antígenos idénticos seleccionados de uno de los grupos o subgrupos de antígenos, preferiblemente en una de las combinaciones arriba mencionadas. Este aspecto puede ser ventajoso, por ejemplo, para una administración escalonada, por ejemplo dependiente del tiempo, de la composición activa inmunoestimuladora de la presente invención a un paciente que la necesite. Los componentes de la composición activa inmunoestimuladora de la presente invención, esto es los cinco ARN que codifican cada uno un antígeno diferente, pueden estar, por ejemplo, contenidos en (diferentes partes de) un kit de composición de partes o pueden, por ejemplo, administrarse por separado representando componentes individuales de la composición activa inmunoestimuladora según la presente invención.

25 Preferiblemente, los ARN como se definen aquí de la composición activa inmunoestimuladora según la invención típicamente comprenden una longitud de alrededor de 50 a aproximadamente 20.000, o 100 a cerca de 20.000 nucleótidos, preferiblemente de alrededor de 250 a aproximadamente 20.000 nucleótidos, muy preferiblemente de alrededor de 500 a aproximadamente 10.000, incluso más preferiblemente de alrededor de 500 a aproximadamente 5.000.

30 De acuerdo con un aspecto, los ARN como se definen aquí de la composición activa inmunoestimuladora pueden estar en forma de un ARN modificado, donde cualquier modificación como se define aquí puede introducirse en los ARN de la composición activa inmunoestimuladora según la invención. Las modificaciones como se definen aquí preferiblemente dan como resultado al menos un ARN estabilizado de la composición activa inmunoestimuladora de la presente
35 invención.

De acuerdo con un primer aspecto, los ARN de la composición activa inmunoestimuladora de la presente invención pueden así proporcionarse como un "ARN estabilizado", preferiblemente un ARNm estabilizado, que se dice es un ARN(m) esencialmente resistente a la degradación *in vivo* (por ejemplo, por una exo- o endo-nucleasa). Dicha estabilización puede efectuarse, por ejemplo,
40 mediante un esqueleto fosfato modificado de al menos un ARN(m) de la composición activa inmunoestimuladora de la presente invención. Una modificación de la estructura en relación con la presente invención es una modificación donde los fosfatos del esqueleto de nucleótidos contenidos en el ARN están químicamente modificados. Los nucleótidos que pueden usarse preferiblemente a este respecto contienen, por ejemplo, una estructura fosfato modificada con fosforotioato,
45 preferiblemente al menos uno de los oxígenos del fosfato contenidos en la estructura fosfato se reemplazan por un átomo de azufre. Los ARN(m) estabilizados también pueden incluir, por ejemplo: análogos de fosfato no iónicos, por ejemplo alquil y aril-fosfonatos, donde el oxígeno del fosfonato cargado se reemplaza por un grupo alquilo o arilo, o fosfodíesteres y alquifosfotriésteres, donde el residuo de oxígeno cargado está presente en forma alquilada. Dichas modificaciones en la
50 estructura típicamente incluyen, sin implicar limitaciones, modificaciones del grupo que consiste en metilfosfonatos, fosforamidatos y fosforotioatos (por ejemplo citidina-5'-O-(1-tiofosfato)).

Los ARN de la composición activa inmunoestimuladora de la presente invención puede 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 de los ARN y típicamente incluye, sin implicar limitaciones, modificaciones de azúcar seleccionadas del grupo consistente en 2'-desoxi-2'-fluorooligoribonucleótido (2'-fluor-2'-desoxicitidin-5'-trifosfato, 2'-fluor-2'-desoxiuridin-5'-trifosfato), 2'-desoxi-2'-desaminoligoribonucleótido (2'-amino-2'-desoxicitidin-5'-trifosfato, 2'-amino-2'-desoxiuridin-5'-trifosfato), 2'-O-alquil-oligoribonucleótido, T-desoxi-2'-C-alquiloligoribonucleótido (2'-O-metilcitidin-5'-trifosfato, 2'-metiluridin-5'-trifosfato), 2'-C-alquiloligoribonucleótido, e isómeros de los mismos (2'-aracitidin-5'-trifosfato, 2'-arauridin-5'-trifosfato), o fosfato de azidotri-(2'-azido-2'-desoxicitidin-5'-trifosfato, 2'-azido-2'-desoxiuridin-5'-trifosfato).

Los ARN de la composición activa inmunoestimuladora de la presente invención puede contener adicional o alternativamente al menos una modificación de bases, que preferiblemente es adecuada para aumentar la expresión de la proteína codificada por la al menos una secuencia de ARN significativamente en comparación con la secuencia de ARN no alterada, esto es natural (= nativa). Significativo en este caso significa un aumento en la expresión de la proteína en comparación con la expresión de la secuencia de ARN nativa en al menos un 20%, preferiblemente al menos 30%, 40%, 50% o 60%, más preferiblemente en al menos un 70%, 80%, 90% o incluso 100% y todavía más preferiblemente en al menos un 150%, 200% o incluso 300% o más. En relación con la presente invención, un nucleótido que tiene tal modificación de bases se selecciona preferiblemente del grupo de nucleótidos con bases modificada consistente en 2-amino-6-cloropurinribosido-5'-trifosfato, 2-aminoadenosin-5'-trifosfato, 2-tiocitidin-5'-trifosfato, 2-tiouridin-5'-trifosfato, 4-tiouridin-5'-trifosfato, 5-aminoalilcitidin-5'-trifosfato, 5-aminoaliluridina-5'-trifosfato, 5-bromocitidin-5'-trifosfato, 5-bromouridin-5'-trifosfato, 5-yodocitidin-5'-trifosfato, 5-yodouridin-5'-trifosfato, 5-metilcitidin-5'-trifosfato, 5-metiluridin-5'-trifosfato, 6-azacitidin-5'-trifosfato, 6-azaauridin-5'-trifosfato, 6-cloropurinribosido-5'-trifosfato, 7-deazaadenosin-5'-trifosfato, 7-deazaguanosin-5'-trifosfato, 8-azaadenosin-5'-trifosfato, 8-azidoadenosin-5'-trifosfato, bencimidazol-ribosido-5'-trifosfato, N1-metiladenosin-5'-trifosfato, N1-metilguanosin-5'-trifosfato, N6-metiladenosin-5'-trifosfato, O6-metilguanosin-5'-trifosfato, pseudouridin-5'-trifosfato o puromicin-5'-trifosfato, xantosin-5'-trifosfato. Se da preferencia particular a los nucleótidos para las modificaciones de base seleccionados del grupo de nucleótidos con bases modificada consistente en 5-metilcitidin-5'-trifosfato, 7-deazaguanosin-5'-trifosfato, 5-bromocitidin-5'-trifosfato y pseudouridin-5'-trifosfato.

De acuerdo con otro aspecto, los ARN de la composición activa inmunoestimuladora de la presente invención también pueden modificarse (y preferiblemente estabilizarse) introduciendo otros nucleótidos modificados que contienen modificaciones de sus fracciones ribosa o bases. En general, los ARN(m) de la composición activa inmunoestimuladora de la presente invención pueden contener cualquier nucleótido nativo (= que ocurre de forma natural), por ejemplo guanosina, uracilo, adenosina y/o citosina o un análogo de los mismos. A este respecto, los análogos de nucleótidos se definen como variantes que no ocurren de forma nativa de nucleótidos que ocurren naturalmente. Asimismo, los análogos son nucleótidos químicamente derivados con grupos funcionales que no ocurren de forma nativa, que se agregan preferiblemente a o se eliminan del nucleótido que ocurre de forma natural o que sustituye a los grupos funcionales que ocurren de manera natural en un nucleótido. De igual forma, puede modificarse cada componente del nucleótido que ocurre de forma natural, principalmente el componente base, el componente de azúcar (ribosa) y/o el componente fosfato que forma la estructura (véase arriba) de la secuencia de ARN. Los análogos de guanosina, uracilo, adenosina y citosina incluyen, pero no se limitan a, cualquier guanosina, uracilo, adenosina, timidina o citosina que ocurren de forma natural o no natural, que ha sido químicamente alterada, 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-cloropurinribosido, 2-aminopurinaribosido, 2'-araadenosina, 2'-aracitidina, 2'-arauridina, 2'-azido-2'-desoxiadenosina, 2'-azido-2'-desoxicitidina, 2'-azido-2'-desoxiguanosina, 2'-azido-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-isopenteniladenosina, 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-tiocitosina, 3-metilcitosina, 4-acetilcitosina, 4-tiouridina, 5-(carboxihidroximetil)uracilo, 5,6-dihidrouridina, 5-aminoalilcitidina, 5-aminoalildesoxiuridina, 5-bromouridina, 5-carboximetilaminometil-2-tiouridina, 5-carboximetilaminometiluridina, 5-cloroaracitosina, 5-fluorouridina, 5-yodouridina, 5-metoxicarbonilmetil-uridina, 5-metoxiuridina, 5-metil-2-tiouridina, 6-azacidina, 6-azauridina, 6-cloro-7-deaza-guanosina, 6-cloropurinribósido, 6-mercaptoguanosina, 6-metil-mercaptopurin-ribósido, 7-deaza-2'-desoxiguanosina, 7-deazaadenosina, 7-metilguanosina, 8-azaadenosina, 8-bromo-adenosina, 8-bromoguanosina, 8-mercaptoguanosina, 8-oxoguanosina, benzimidazol-ribósido, beta-D-manosilqueosina, dihidrouridina, inosina, N1-metiladenosina, N6-([6-aminohexil]carbamoilmetil)adenosina, N6-isopenteniladenosina, N6-metiladenosina, N7-metilxantosina, metil éster de ácido N-uracil-5-oxiacético, puromicina, queosina, ácido uracil-5-oxiacético, metil éster de ácido uracil-5-oxiacético, wibutoxosina, xantosina y xiloadenosina. La preparación de dichos análogos es conocida por los expertos en la técnica, por ejemplo de las Patentes de EE.UU. 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 como se describe anteriormente, se puede dar particular preferencia a aquellos análogos que aumentan la inmunogenicidad del ARN de la composición activa inmunoestimuladora de la invención y/o no interfiere con otra modificación del ARN que se ha introducido.
- 20 De acuerdo con un aspecto particular, los ARN de la composición activa inmunoestimuladora de la presente invención puede contener una modificación de lípido. Dicho ARN con lípido modificado típicamente comprende un ARN como se define aquí. Dicho ARN con lípido modificado típicamente comprende al menos un enlazador covalentemente unido a ese ARN y el al menos un lípido covalentemente enlazado con el enlazador respectivo. De manera alternativa, el ARN con lípido modificado comprende al menos un ARN como se define aquí y al menos un lípido covalentemente enlazado (bifuncional) (sin enlazador) con ese ARN. De acuerdo con una tercera alternativa, el ARN con lípido modificado comprende un ARN como se define aquí, al menos un enlazador covalentemente unido a ese ARN y al menos un lípido covalentemente unido al enlazado respectivo, y también al menos un lípido (bifuncional) covalentemente unido (sin enlazador) con un ARN.
- 30 El lípido contenido en los ARN de la composición activa inmunoestimuladora (complejado o covalentemente unido al mismo) es típicamente un lípido o residuo lipofílico que preferentemente es biológicamente activo en sí mismo. Dichos lípidos preferiblemente incluyen sustancias naturales o compuestos tales como, por ejemplo, vitaminas, por ejemplo alfa-tocoferol (vitamina E), incluyendo RRR-alfa-tocoferol (antes D-alfa-tocoferol), L-alfa-tocoferol, racemato de D,L-alfa-tocoferol, succinato de vitamina E (VES), o vitamina A y sus derivados, por ejemplo ácido retinoico, retinol, vitamina D y sus derivados, por ejemplo vitamina D y también sus precursores de ergosterol, 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 dehidrocólico, cortisona, digoxigenina, testosterona, colesterol o tiocolesterol.
- 40 Otros lípidos o residuos lipofílicos incluyen, sin limitarse a, polialquilenglicoles (Oberhauser et al., Nucl. Acids Res., 1992, 20, 533), grupos alifáticos, por ejemplo compuestos C1-C20-alcanos, C1-C20-alquenos o C1-C20-alcanol, etc., por ejemplo residuos dodecanodiol, hexadecanol o undecilo (Saison-Behmoaras et al., EMBO J, 1991, 10, 1111; Kabanov et al., FEBS Lett., 1990, 259, 327; Svinarchuk et al., Biochimie, 1993, 75, 49), fosfolípidos, por ejemplo fosfatidilglicerol, diacilfosfatidilglicerol, fosfatidilcolina, dipalmitoilfosfatidilcolina, distearoilfosfatidilcolina, fosfatidilserina, fosfatidiletanolamina, di-hexadecil-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 palmitina (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 grados saturados y mono- o poli-insaturados, etc.

Los ARN de la composición activa inmunoestimuladora de la presente invención también pueden estabilizarse con el fin de evitar la degradación del ARN *in vivo* de varias formas. En la técnica es sabido que la inestabilidad y la degradación (rápida) del ARNm o de un ARN *in vivo* en general puede representar un problema serio en la aplicación de composiciones basadas en ARN. Esta inestabilidad del ARN se debe típicamente a las enzimas degradantes de ARN, "ARNasas" (ribonucleasas), donde la contaminación con dichas ribonucleasas puede a veces degradar completamente el ARN en solución. Al mismo tiempo, la degradación natural del ARNm en el citoplasma celular está finamente regulada y las contaminaciones con RNasa generalmente pueden eliminarse por un tratamiento especial antes de usar dichas composiciones, en particular con pirocarbonato de dietilo (DEPC). A este respecto, se conocen numerosos mecanismos de degradación natural en la técnica anterior que también pueden utilizarse. Por ejemplo, la estructura terminal es típicamente de vital importancia para un ARNm *in vivo*. Como ejemplo, en el extremo 5' de los ARNm que ocurren de forma natural normalmente existe una llamada "estructura de bloqueo" (un nucleótido de guanosina modificado) y en el extremo 3' hay típicamente una secuencia de hasta 200 nucleótidos de adenosina (la llamada cola poli-A).

Los ARN de la composición activa inmunoestimuladora de la presente invención, particularmente si se proporcionan como ARNm, pueden estabilizarse frente a la degradación por RNasas por la adición de una llamada estructura "de bloqueo 5'". Se da particular preferencia a un m7G(5')ppp (5'(A,G(5')ppp(5')A o G(5')ppp(5')G como estructura de bloqueo 5'. Sin embargo, dicha modificación se introduce únicamente si una modificación, por ejemplo una modificación de lípidos, no se ha introducido ya en el extremo 5' del ARN(m) de la composición inmunoestimuladora de la invención o si la modificación no interfiere con las propiedades inmunogénicas del ARN(m) (sin modificar o químicamente modificado).

De conformidad con otro aspecto preferido, los ARN de la composición activa inmunoestimuladora de la presente invención pueden contener, especialmente si el ARN está en forma de ARNm, una cola poli-A en el extremo 3', de típicamente alrededor de 10 a 200 nucleótidos de adenosina, preferiblemente de alrededor de 10 a 100 nucleótidos de adenosina, más preferiblemente de alrededor de 20 a 100 nucleótidos de adenosina o todavía más preferiblemente de alrededor de 40 a 80 nucleótidos de adenosina.

Según otro aspecto preferente, los ARN de la composición activa inmunoestimuladora de la presente invención pueden contener, especialmente si el ARN está en forma de ARNm, una cola poli-C en el extremo 3', de típicamente alrededor de 10 a 200 nucleótidos de citosina, preferiblemente alrededor de 10 a 100 nucleótidos de citosina, más preferiblemente de alrededor de 20 a 70 nucleótidos de citosina o todavía más preferiblemente de alrededor de 20 a 60 o incluso de 10 a 40 nucleótidos de citosina.

Los ARN de la composición activa inmunoestimuladora de la presente invención pueden estar modificados y, por tanto, estabilizados, en especial si el ARN está en forma de ARNm. El contenido de G/C de las regiones codificadoras de los ARN tal como se definen en la reivindicación 1 se modifica.

Así, el contenido de G/C de la región codificadora de los ARN(m) de la composición activa inmunoestimuladora aumenta como se define en la reivindicación 1 en comparación con el contenido G/C de la región codificadora de su ARN(m) de tipo silvestre particular, es decir el ARN(m) no modificado.

La secuencia de aminoácidos no codificada de los ARN(m) preferiblemente 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 activa inmunoestimuladora de la presente invención se basa en el hecho de que la secuencia de cualquier región del ARN(m) a ser traducida es importante para la traducción eficiente de dicho ARN(m). Por tanto, es importante la composición y la secuencia de diversos nucleótidos. En particular, las secuencias que tienen un contenido incrementado de G (guanósina)/C (citosina) son más estables que las secuencias que tienen un

5 contenido de A (adenosina)/U (uracilo) incrementado. De acuerdo con la invención, los codones del ARN(m) varían en comparación con su ARN(m) de tipo silvestre, al mismo tiempo que retienen la secuencia de aminoácidos traducida, de forma que incluyen una cantidad incrementada de nucleótidos G/C. Con respecto al hecho de que varios codones codifican para uno y el mismo aminoácido (la llamada degeneración del código genético), pueden determinarse los codones más favorables para la estabilidad (el llamado uso alternativo de codones).

10 Dependiendo del aminoácido a ser codificado por los ARN(m), existen varias posibilidades para la modificación de las secuencias de ARN(m) en comparación con su secuencia de tipo silvestre. En el caso de aminoácidos que son codificados por los codones que contienen exclusivamente nucleótidos G o C, no es necesario la 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 modificación, ya que no hay A o U presente.

15 Por el contrario, los codones que contienen nucleótidos A y/o U pueden modificarse por sustitución de otros codones que codifican para los mismos aminoácidos pero que no contienen A y/o U. Ejemplos de estos son:

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

20 En otros casos, aunque los nucleótidos de A o U no pueden ser eliminados de los codones, es posible disminuir el contenido de A y U empleando codones que tienen un contenido más bajo de nucleótidos A y/o U. Ejemplos de éstos son:

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

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

40 Las sustituciones enumeradas arriba pueden usarse individualmente o en todas las combinaciones posibles para aumentar el contenido de G/C de los ARN(m) de la composición activa inmunoestimuladora de la presente invención en comparación con su ARN(m) de tipo silvestre particular (esto es la secuencia original). Por tanto, por ejemplo, todos los codones para Thr que ocurren en la secuencia de tipo silvestre pueden modificarse a ACC (o ACG). Sin embargo,

45 preferiblemente, por ejemplo, las combinaciones de las posibilidades de sustitución anteriores se usan:
 sustitución de todos los codones que codifican para Thr en la secuencia original (ARN(m) tipo silvestre) a ACC (o ACG) y
 la sustitución de todos los codones que originalmente codifican para Ser a UCC (o UCG o AGC);
 50 la sustitución de todos los codones que codifican para Ile en la secuencia original a AUC y
 la sustitución de todos los codones que originalmente codifican para Lys a AAG y
 la sustitución de todos los codones que originalmente codifican para Tyr a UAC;

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

20 Preferiblemente, el contenido de G/C de la región codificadora de los ARN(m) de la composición activa inmunoestimuladora de la presente invención se incrementa en al menos un 7%, muy preferiblemente en al menos un 15%, particularmente preferible en al menos un 20%, en comparación con el contenido de G/C de la región codificada del ARN(m) de tipo silvestre que codifica para un antígeno, una proteína antigénica o un péptido antigénico como se define aquí o un fragmento o variante del mismo. De acuerdo con una realización específica, al menos un 5%, 10%,
 25 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, más preferiblemente al menos un 70%, aun más preferiblemente al menos un 80% y todavía más preferiblemente al menos un 90%, 95% o incluso un 100% de los codones sustituibles en la región que codifica para un antígeno, proteína antigénica o péptido antigénico como se define aquí o un fragmento o variante o toda la secuencia del ARN(m) de tipo silvestre son sustituidos, incrementando así el contenido de G/C de dicha secuencia.

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

35 Otra modificación preferida de los ARN(m) de la composición activa inmunoestimuladora de la presente invención se basa en el hecho de que la eficiencia de traducción también es determinada por una frecuencia diferente en la ocurrencia de tARN en las células. Por tanto, si los llamados "codones raros" están presentes en los ARN(m) de la composición activa inmunoestimuladora de la presente invención en un grado incrementado, la secuencia de los ARN(m) modificada correspondiente se traducen en un grado significativamente más pobre que si están presentes los
 40 codones que codifican para los ARNt "frecuentes".

En los ARN(m) modificados de la composición activa inmunoestimuladora de la presente invención, la región que codifica para la proteína (adyuvante) está modificada en comparación con la región correspondiente del ARN(m) de tipo silvestre, de forma que al menos un codón de la secuencia de tipo silvestre que codifica para un ARNt que es relativamente raro en la célula es intercambiado por
 45 un codón que codifica para un ARNt que es relativamente frecuente en la célula y porta el mismo aminoácido que el ARNt relativamente raro. Mediante esta modificación, las secuencias de los ARN(m) de la composición activa inmunoestimuladora de la presente invención se modifica de forma que se insertan los codones para los que están disponibles los ARNt que ocurren frecuentemente. En otras palabras, mediante esta modificación todos los codones de la secuencia de tipo silvestre
 50 que codifican para un ARNt que es relativamente raro en la célula pueden en cada caso intercambiarse por un codón que codifica para 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 conocen qué ARNt ocurren con relativa frecuencia en la célula y cuáles, en contraste, ocurren relativamente rara vez; véase por ejemplo, Akashi, Curr. Opin. Genet. Dev. 2001, 11 (6): 660-666. Son especialmente preferentes los codones que se usan para el aminoácido particular del ARNt que ocurre con más frecuencia y, por ejemplo, el codón Gly, que usa el ARNt que ocurre más frecuentemente en la célula (humana). Es particularmente preferible enlazar el contenido G/C secuencial que es incrementado, en particular maximizado, en los ARN(m) modificados de la composición activa inmunoestimuladora de la presente invención con los codones "frecuentes" sin modificar la secuencia de aminoácidos de la proteína que codifica para la región codificadora del ARN(m). Este aspecto preferido permite proporcionar ARN(m) estabilizados (modificados) eficientemente traducidos a la composición activa inmunoestimuladora de la presente invención.

La determinación de un ARN(m) modificado de la composición activa inmunoestimuladora de la presente invención como se describe anteriormente (contenido de G/C incrementado; intercambio de ARNt) puede llevarse a cabo empleando el programa de ordenador que se explica en WO 02/098443. Empleando 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 forma que resulta un contenido de G/C máximo, en combinación con el uso de codones que codifican para ARNt que ocurren tan frecuentemente como sea posible en la célula, la secuencia de aminoácidos codificada por el al menos un ARN(m) modificado preferiblemente no está modificada en comparación con la secuencia no modificada. Alternativamente, también es posible modificar únicamente el contenido de G/C o solamente el codón de uso en la secuencia original. El código fuente en Visual Basic 6.0 (entorno de desarrollo usado: Microsoft Visual Studio Enterprise 6.0 con Servicepack 3) también se describe en la WO 02/098443.

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

De acuerdo con otro aspecto, los ARN(m) de la composición activa inmunoestimuladora de la presente invención pueden modificarse con respecto a elementos de secuencia potencialmente desestabilizadores. En particular, la región codificadora y/o la región no traducida 5' y/o 3' de este al menos un ARN(m) puede modificarse en comparación con el ARN(m) de tipo silvestre particular, de forma que no contenga elementos de secuencia desestabilizadores, la secuencia de aminoácidos codificada del al menos un ARN(m) modificado preferiblemente sin modificarse en comparación con su ARN(m) de tipo silvestre particular. Se sabe que, por ejemplo en las secuencias de ARN eucarióticos existen elementos de secuencia desestabilizadores (DSE) a los cuales se unen las proteínas señal y que regulan la degradación enzimática el ARN *in vivo*. Para una mayor estabilización de los ARN(m) modificados, opcionalmente en la región que codifica para un antígeno, una proteína antigénica o péptido antigénico como se define aquí, puede llevarse a cabo una o más modificaciones en comparación con la región correspondiente del ARN(m) de tipo silvestre, para que ningún otro elemento de secuencia desestabilizador pueda encontrarse ahí. El DSE presente en las regiones sin traducir (3'- y/o 5'-UTR) también puede eliminarse de los ARN(m) de la composición activa inmunoestimuladora de la presente invención mediante dichas modificaciones.

Dichas secuencias desestabilizadoras son, por ejemplo, secuencias ricas en AU (AURES), que ocurren en las secciones 3'-UTR de los numerosos ARN inestables (Caput et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 1986, 83: 1670 a 1674). Por tanto, los ARN(m) de la composición activa inmunoestimuladora de la presente invención preferiblemente están modificados en comparación con el ARN(m) de tipo silvestre, de forma que los ARN(m) no contienen dichas secuencias desestabilizadoras. Esto también se aplica a aquellos motivos de secuencia que son reconocidos como posibles endonucleasas, por ejemplo la secuencia GAACAAG, que está contenida en el

segmento 3'-UTR del gen que codifica para el receptor de la transferina (Binder et al., EMBO J. 1994, 13: 1969 a 1980). Estos motivos de secuencia preferiblemente se eliminan en los ARN(m) de la composición activa inmunoestimuladora de la presente invención. Los ARN(m) de la composición activa inmunoestimuladora de la presente invención pueden tener, en una forma modificada, al menos una IRES como se define arriba y/o al menos una secuencia estabilizadora 5' y/o 3', por ejemplo para aumentar la unión de ribosomas o permitir la expresión de diferentes antígenos codificadores localizados en al menos un ARN bi- o incluso multicistrónico de la composición activa inmunoestimuladora de la presente invención. Preferentemente, los ARN(m) de la composición activa inmunoestimuladora de la presente invención tienen además al menos una secuencia estabilizadora 5' y/o 3'. Estas secuencias estabilizadoras en las regiones no traducidas 5' y/o 3' tienen el efecto de aumentar la vida media de los ARN(m) en el citosol. Estas secuencias estabilizadoras pueden tener una homología de secuencia del 100% con las secuencias que ocurren naturalmente en virus, bacterias y eucariontes, pero también pueden ser parcial o completamente sintéticas. Las secuencias no traducidas (UTR) del gen globina, por ejemplo de Homo sapiens o Xenopus laevis, pueden mencionarse como ejemplos de secuencias estabilizadoras que pueden usarse en la presente invención para un ARN estabilizado. Otro ejemplo de secuencia estabilizadora tiene la fórmula general (C/U)CCANxCCC(U/A)PyxUC(C/U)CC (SEQ ID NO: 28), que está contenida en el 3'UTR del ARN muy estable que codifica para la globina, colágeno (I), 15-lipoxigenasa o tirosinahidroxilasa (véase Holcik et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 1997, 94: 2410 a 2414). Dichas secuencias estabilizadoras pueden usarse 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 activa inmunoestimuladora de la presente invención preferiblemente están presentes como ARN estabilizados con globina en UTR (regiones no traducidas), en particular como ARN estabilizado con globina en UTR.

En cualquier caso, las sustituciones, adiciones o eliminaciones de las bases se llevan a cabo preferiblemente con los ARN de la composición activa inmunoestimuladora de la presente invención empleando una matriz de ADN para la preparación de los ARN de la composición activa inmunoestimuladora de la presente invención mediante técnicas bien conocidas de mutagénesis dirigida a sitio o mediante estrategias de unión 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 dicho proceso para preparar los ARN(m), una molécula de ADN correspondiente puede transcribirse *in vitro*. Esta matriz de ADN preferiblemente comprende un promotor adecuado, por ejemplo un promotor T7 o SP6, para la transcripción *in vitro*, que es seguida de la secuencia de nucleótidos deseada para los ARN a preparar y una señal de parada para la transcripción *in vitro*. La molécula de ADN que forma la matriz de un ARN de interés puede prepararse por proliferación fermentativa y aislamiento subsecuente como parte de un plásmido que puede replicarse en bacterias. Plásmidos que pueden mencionarse 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), pGEM® series, por ejemplo pGEM®-1 (número de acceso GenBank X65300; de Promega) y pSP64 (número de acceso GenBank X65327); véase además Mezei y Starts, Purification of PCR Products, en: Griffin y Griffin (ed.), PCR Technology: Current Innovation, CRC Press, Boca Raton, FL, 2001.

La estabilización de los ARN de la composición activa inmunoestimuladora de la presente invención puede llevarse a cabo mediante asociación o complejación de los ARN con o uniéndolo a un compuesto catiónico, en particular un compuesto policatiónico, por ejemplo un péptido (poli)catiónico o proteína. En particular, el uso de protamina, nucleolina, espermina o espermidina como proteína de unión a ácido nucleico policatiónica al ARN es particularmente efectivo. Además, el uso de otros péptidos o proteínas catiónicas, tal como poli-L-lisina o histonas, también es posible. Este procedimiento para estabilizar el ARN se describe en la EP-A-1083232. Otras sustancias catiónicas adicionales preferidas que pueden usarse para estabilizar el ARN de la composición activa inmunoestimuladora de la presente invención incluyen polisacáridos catiónicos, por ejemplo quitosano, polibreno, polietilenimina (PEI) o poli-L-lisina (PLL), etc. La asociación o complejación del ARN de la composición activa inmunoestimuladora de la invención con compuestos catiónicos, por ejemplo proteínas catiónicas o lípidos catiónicos, por ejemplo oligofectamina como reactivo de complejación basado en lípidos, preferiblemente aumenta la transferencia de los ARN presentes

como un componente farmacéuticamente activo en las células que serán tratadas o en el organismo a ser tratado. También se refiere a la descripción aquí con respecto al efecto de estabilización del ARN de la composición activa inmunoestimuladora de la presente invención por complejación, que también mantiene la estabilización del ARN.

- 5 De acuerdo con otro aspecto particularmente preferido, los ARN de la composición activa inmunoestimuladora pueden adicional o alternativamente codificar para un péptido señal secretor. Dichos péptidos señal son secuencias que típicamente tienen una longitud de alrededor de 15 a 30 aminoácidos y se localizan preferiblemente en el N-terminal del péptido codificado, sin limitarse al mismo. Los péptidos señal aquí definidos preferiblemente permiten el transporte del antígeno, proteína antigénica o péptido antigénico como es codificado por los ARN de la composición activa
10 inmunoestimuladora a un compartimento celular definido, preferiblemente la superficie celular, el retículo endoplásmico (ER) o el compartimento endosomal-lisosomal. Ejemplos de secuencias de péptidos señal secretores como se definen aquí incluyen, pero no se limitan a, secuencias señal de moléculas MHC clásicas o no clásicas (por ejemplo secuencias señal de moléculas MHC I y II, por ejemplo de la molécula clase I MHC HLA-A*0201), secuencias señal de citosinas o inmunoglobulinas como se definen aquí, secuencias señal de la cadena invariante de inmunoglobulinas o anticuerpos como se definen aquí, secuencias señal de Lamp1, Tapasin, Erp57, Calreticulina, Calnexina y otras proteínas relacionadas con la membrana o de otras proteínas asociadas al retículo endoplásmico (ER) o al compartimento endosomal-lisosomal. Con particular preferencia, pueden usarse aquí las
15 secuencias señal de la molécula clase I MHC HLA-A*0201. Cualquiera de las modificaciones anteriores puede aplicarse a los ARN de la composición activa inmunoestimuladora de la presente invención y además a cualquier ARN(m) como se usa en el contexto de la presente invención y, si fuera adecuado o necesario, puede mezclarse con cualquier otro en cualquier combinación, siempre y cuando estas combinaciones de las modificaciones no interfieran entre sí con los ARN respectivos.
20 El experto en la técnica será capaz de elegir de forma apropiada.

De acuerdo con otra realización, la composición activa inmunoestimuladora según la invención puede comprender un adyuvante. En este contexto, un adyuvante puede entenderse como cualquier compuesto adecuado para apoyar la administración y el suministro de la composición activa inmunoestimuladora de conformidad con la invención. Además, dicho adyuvante puede, sin unirse,
30 iniciar o aumentar una respuesta inmune del sistema inmune innato, esto es una respuesta inmune no específica. En otras palabras, cuando se administra, la composición activa inmunoestimuladora según la invención típicamente inicia una respuesta inmune adaptativa debido a los al menos cinco antígenos codificados por los al menos cinco ARN contenidos en la composición activa inmunoestimuladora inventiva.

35 Adicionalmente, la composición activa inmunoestimuladora según la invención puede generar una respuesta inmune innata (de respaldo) debido a la adición de un adyuvante como se define aquí para la composición activa inmunoestimuladora de la invención. Dicho adyuvante puede seleccionarse de cualquier adyuvante conocido por el experto en la técnica y adecuado para el presente caso, esto es apoyando la inducción de una respuesta inmune en un mamífero.

40 Preferiblemente, el adyuvante se selecciona del grupo que consiste en, sin limitarse a, TDM, MDP, dipéptido muramilo, plurónicos, solución alum, hidróxido de aluminio, ADJUMER™ (polifosfaceno); gel de fosfato de aluminio; glucanos de algas; algamulina; gel de hidróxido de aluminio (alum); gel de hidróxido de aluminio altamente adsorbente de proteína; gel de hidróxido de aluminio de baja viscosidad; AF o SPT (emulsión de esqualeno (5%), Tween 80 (0,2%), Pluronic L121 (1,25%),
45 solución salina regulada con fosfato, pH 7,4); AVRIDINE™ (propanodiamina); BAY R1005™ ((hidroacetato de N-(2-desoxi-2-L-leucilamino-b-D-glucopiranosil)-N-octadecildodecanoil-amida); CALCITRIOL™ (1-alfa-25-dihidroxitamina D3); gel de fosfato de calcio; CAPTM (nanopartículas de fosfato de calcio); holotoxina de cólera, proteína de fusión de cólera-toxina-A1-proteína-A-D-fragmento, subunidad B de toxina de cólera; CRL 1005 (copolímero de bloqueo P1205); liposomas que contienen citocina; DDA (bromuro de dimetildioctadecilamonio); DHEA (dehidroespiroesterona); DMPC (dimiristoilfosfatidilcolina); DMPG (dimiristoilfosfatidilglicerol); complejo DOC/alum (sal de sodio de ácido desoxicólico); adyuvante completo de Freund; adyuvante incompleto de Freund; gamma-inulina; adyuvante de Gerbu (mezcla de: i) N-acetilglucosaminil-(P1-4)-N- acetilmuramil-L-
50

- 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]quinolin-4-amina); ImmTher™ (dipalmitato de N-acetilglucosaminil-N-acetilmuramil-L-Ala-D-isoGlu-L-Ala-glicerol); DRV (inmunoliposomas preparados por deshidratación-rehidratación de vesículas); interferon-gamma; interleucina-1-beta; interleucina-2; interleucina-7; interleucina-12; ISCOMS™; ISCOMPREP 7.0.3.™; liposomas; LOXORIBINE™ (7-alil-8-oxoguanosina); adyuvante oral LT (Ecoli lábil enterotoxina-protóxina); microesferas y micropartículas de cualquier composición; MF59™; (emulsión escualeno-agua); MONTANIDE ISA 51™ (adyuvante de Freund incompleto 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-alanin-2-(sal monosódica de 1,2-dipalmitoil-sn-glicero-3-(hidroxifosforilo)etilamida); MURAMETIDE™ (Nac-Mur-L-Ala-D-GIn-OCH₃); MURAPALMITINE™ y D-MURAPALMITINE™ (Nac-Mur-L-Thr-D-isoGIn-sn-gliceroldipalmitoilo); NAGO (neuraminidasa-galactosa oxidasa); nanoesferas o nanopartículas de cualquier composición; NISV (vesículas surfactantes no iónicas); PLEURAN™ (β-glucano); PLGA, PGA y PLA (homo- y copolímero de ácido láctico y ácido glicólico; microesferas/nanoesferas); PLURONIC L121™; PMMA (metacrilato de polimetilo); PORDDS™ (microesferas proteínoideas); derivados de carbamato de polietileno; poli-rA: poli-rU (complejo de ácido poliadenílico-ácido poliuridílico); polisorbato 80 (Tween 80); cocleatos de proteína (Avanti Porlar Lipids, Inc., Alabaster, AL); STIMULON™ (QS-21); Quil-A (Quil-A saporin); S-28463 (4-amino-otec-dimetil-2-etoximetil-1H-imidazo[4,5-c]quinolin-1-etanol); SAF-1™ ("Formulación de adyuvante Syntex"); proteoliposomas Sendai y matrices de lípidos que contienen Sendai; Span-85 (trioleato de sorbitano); Specol (emulsión de Marcol 52, Span 85 y Tween 85); escualeno o Robane® (2,6,10,15,19,23-hexametil-tetracosan 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 I]-MDP; N-acetilmuramil-L-treonil-D-isoglutamina); partículas Ty (Ty-VLPs o partículas de tipo virus); liposomas Walter-Reed (liposomas que contienen lípidos A adsorbidos en hidróxido de aluminio) y lipopéptidos, incluyendo Pam3Cys, en particular sales de aluminio, tales como Adju-phos, Alhydrogel, Rehydragel; emulsiones, incluyendo CFA, SAF, IFA, MF59, Provac, TiterMax, Montanide, Vaxfectin; copolímeros que incluyen Optivax (CRL1005), LI 21, Poloaxmer4010), etc.; liposomas, incluyendo Stealth, cocleatos, incluyendo BIORAL; adyuvantes derivados de plantas, incluyendo QS21, Quil A, Iscomatrix, ISCOM; adyuvantes adecuados para la coestimulación que incluyen Tomatino, 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 murina TLR 1 -13, ISS-1018, IC31, imidazoquinolinas, Ampligen, Ribis29, IMOxine, IRIV, VLP, toxina de cólera, toxina termo-lábil, Pam3Cys, Flagelina, ancla de GPI, LNFPIII/Lewis X, péptidos antimicrobianos, UC-1V150, proteína de fusión RSV, cdiGMP; y adyuvantes adecuados como antagonistas que incluyen neuropéptidos CGRP.
- 40 También pueden seleccionarse adyuvantes adecuados de compuestos catiónicos o policatiónicos donde el adyuvante se prepara preferiblemente después de la complejación de los ARN de la composición activa inventiva inmunoestimuladora con el compuesto catiónico o policatiónico. La asociación o complejación del ARN de la composición activa inmunoestimuladora con compuestos catiónicos o policatiónicos como se definen aquí preferiblemente provee de propiedades adyuvantes y confiere un efecto estabilizador a los ARN de la composición activa inmunoestimuladora. Son particularmente preferentes los compuestos catiónicos o policatiónicos que se seleccionan de péptidos o proteínas catiónicos o policatiónicos que incluyen protamina, nucleolina, espermina o espermidina u otros péptidos o proteínas catiónicos, tales como poli-L-lisina (PLL), poli-arginina, polipéptidos básicos, péptidos penetradores de células (CPP), incluyendo péptidos de unión a VIH, Tat, VIH-1 Tat (VIH), péptidos derivados de Tat, Penetratina, péptidos VP22 derivados o análogos, HSV VP22 (Herpes simple), MAP, KALA o dominios de transducción de proteína (PTD, PpT620, péptidos ricos en prolina, péptidos ricos en arginina, péptidos ricos en lisina, MPG-peptids, Pep-1, L-oligómeros, péptido(s) de calcitonina, péptidos derivados de Antennapedia (particularmente de Drosophila antennapedia), pAntp, plsl, FGF, Lactoferrina, Transportano, Buforin-2, Bac715-24, SynB, SynB(1), pVEC, péptidos derivados de hCT, SAP, protamina, espermina, espermidina o histonas. Otros compuestos catiónicos o policatiónicos preferidos pueden incluir polisacáridos

cati6nicos, por ejemplo quitosano, polibreno, pol6meros cati6nicos, por ejemplo polietilenimina (PEI), l6pidos cati6nicos, por ejemplo DOTMA: cloruro de [1 -(2,3-sioleiloxi)propil]-N,N,N-trimetilamonio, DMRIE, di-C14-amidina, DOTIM, SAINT, DC-Choi, BGTC, CTAP, DOPC, DODAP, DOPE: Dioleil fosfatidiletanolamina, DOSPA, DODAB, DOIC, DMEPC, DOGS: Dioctadecilamidoglicilspermina, DIMRI: Bromuro de dimiristooxipropil-dimetil-hidroxietyl-amonio, DOTAP: dioleiloxi-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-dihexadeciloxipropil-oximetiloxi)etyl]trimetilamonio, CLIP9: rac-[2(2,3-dihexadeciloxipropil-oxisucciniloxijetyl)-trimetilamonio, oligofectamina, o pol6meros cati6nicos o policati6nicos, por ejemplo poliamino6cidos modificados, tal como pol6meros de β -amino6cidos o poliamidas inversas, polietilenos modificados, como PVP (bromuro de poli(N-etyl-4-vinilpiridinio)), acrilatos modificados como pDMAEMA (metilacrilato de polidimetilaminoetyl)), amidoaminas modificadas como pAMAM (poli(amidoamina)), polibetaamino6ster (PBAE) modificado, como pol6meros de diamina con extremo modificado con 1,4-butanodiol diacrilato-co-5-amino-1-pentanol, dendr6meros como dendr6meros de polipropilamina o dendr6meros a base de pAMAM, poliimina(s), como PEI: poli(etilenimina), poli(propilenimina), polialilamina, pol6meros a base de estructuras de az6car, tales como pol6meros a base de ciclodextrina, pol6meros a base de dextrano, quitosano, pol6meros a base de estructuras silano, como copol6meros de PMOXA-PDMS, pol6meros en bloque que consisten en una combinaci6n de uno o m6s bloques cati6nicos (por ejemplo seleccionados de un pol6mero cati6nico como los que se mencionan arriba) y uno o m6s bloques hidr6filos o hidr6fobos (por ejemplo polietilenglicol).

De forma adicional, las prote6nas o p6ptidos cati6nicos o policati6nicos preferidos que pueden usarse como adyuvante por complejaci6n con los ARN de la composici6n activa inmunoestimuladora puede seleccionarse de las siguientes prote6nas o p6ptidos que tienen la siguiente f6rmula general (I): (Arg)_i;(Lys)_m;(His)_n;(Orn)_o;(Xaa)_x, en la que $i + m + n + o + x = 8-15$, y i, m, n u o , independientemente entre s6, pueden ser un n6mero seleccionado de 0, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14 o 15, siempre y cuando el contenido total de Arg, Lys, His y Orn represente al menos un 50% de todos los amino6cidos del oligop6ptido; y Xaa puede ser cualquier amino6cido seleccionado de amino6cidos nativos (= que ocurren naturalmente) o no nativos excepto Arg, Lys, His u Orn; y x puede ser cualquier n6mero seleccionado de 0, 1, 2, 3 o 4, siempre y cuando el contenido total de Xaa no exceda el 50% de todos los amino6cidos del oligop6ptido. Oligoargininas particularmente preferidas en este contexto son por ejemplo Arg₇, Arg₈, Arg₉, Arg₇, H₃R₉, R₉H₃, H₃R₉H₃, YSSR₉SSY, (RKH)₄, Y(RKH)₂R. Adyuvantes adecuados pueden seleccionarse tambi6n de 6cidos nucleicos que tienen la f6rmula (II): G_iX_mG_n, en la que: G es guanosina, uracilo o un an6logo de guanosina o uracilo; X es guanosina, uracilo, adenosina, timidina, citosina o un an6logo de los nucle6tidos antes mencionados; i es un entero de 1 a 40, en el que cuando $i = 1$ G es guanosina o un an6logo de la misma, cuando $i > 1$ al menos el 50% de los nucle6tidos son guanosina o un an6logo de la misma; m es un entero y es al menos 3; donde cuando $m = 3$ X es uracilo o un an6logo del mismo, cuando $m > 3$ existen al menos 3 uracilos sucesivos o an6logos de uracilo; n es un entero de 1 a 40, donde $n = 1$ G guanosina o un an6logo de la misma, cuando $n > 1$ al menos el 50% de los nucle6tidos son guanosina o an6logos de la misma.

Otros adyuvantes adecuados pueden seleccionarse tambi6n de 6cidos nucleicos que tienen la f6rmula (III): C_iX_mC_n, donde: C es citosina, uracilo o un an6logo de citosina o uracilo; X es guanosina, uracilo, adenosina, timidina, citosina o un an6logo de los nucle6tidos mencionados; i es un entero de 1 a 40, donde cuando $i = 1$ C es citosina o un an6logo de la misma, cuando $i > 1$ al menos el 50% de los nucle6tidos son citosina o un an6logo de la misma; m es un entero y es al menos 3; donde cuando $m = 3$ X es uracilo o un an6logo del mismo, cuando $m > 3$ existen al menos 3 uracilos sucesivos o an6logos de uracilo; n es un entero de 1 a 40, donde cuando $n = 1$ C es citosina o un an6logo de la misma, cuando $n > 1$ al menos el 50% de los nucle6tidos son citosina o un an6logo de la misma.

De conformidad con una realizaci6n preferida, la presente invenci6n puede tambi6n proporcionar una vacuna que contiene la composici6n activa inmunoestimuladora de acuerdo con la invenci6n.

La vacuna inventiva puede contener adicionalmente un vehículo farmacéuticamente aceptable y/u otras sustancias auxiliares y aditivos y/o adyuvantes. Los antígenos codificados por los ARN de la composición activa inmunoestimuladora contenidos en la vacuna de la invención son como se indica en la reivindicación 1. Los antígenos de proteína son NY-ESO1 [número de acceso NM_001327],
 5 sobrevivina [número de acceso AF077350], 5T4 [número de acceso NM_006670], MAGE-C1 y MAGE-C2 como se definen aquí. Los antígenos del siguiente subgrupo comprenden MAGE-A2 y MAGE-A3, como se define aquí o también se describen hTERT [número de acceso NM_198253] y WT1 [número de acceso NM_000378]. La vacuna de la invención típicamente comprende una cantidad segura y efectiva de los ARN de la composición activa inmunoestimuladora como se define arriba
 10 que codifican al menos cinco antígenos como se definen arriba. También se describen aquí vacunas que comprenden ARN que codifican al menos seis antígenos como se definen aquí, en cualquiera de las combinaciones indicadas. Tal como se usa aquí, "cantidad segura y efectiva" significa una cantidad de los ARN de la composición activa inmunoestimuladora en la vacuna como se define arriba que es suficiente para inducir significativamente una modificación positiva del cáncer pulmonar de células no pequeñas (NSCLC) a tratar, más preferiblemente de condiciones relacionadas con los tres subtipos principales de cáncer pulmonar no de células pequeñas (NSCLC) incluyendo, pero no limitados a, carcinoma pulmonar de células escamosas, adenocarcinoma y carcinoma pulmonar de células grandes. Sin embargo, al mismo tiempo, una "cantidad segura y efectiva" es lo suficientemente pequeña para evitar efectos secundarios serios, es decir permite una
 20 relación sensible entre ventajas y riesgos. La determinación de estos límites típicamente yace dentro del alcance del juicio médico sensible. En relación con la vacuna de la invención, la expresión "cantidad segura y efectiva" preferiblemente significa una cantidad del ARN (y por tanto de los al menos cinco antígenos codificados) que es adecuada para estimular el sistema inmune adaptativo de manera que no se obtengan reacciones inmunes excesivas o dañinas, sino que, preferiblemente, también dichas reacciones no inmunes estén a un nivel medible. Tal "cantidad segura y efectiva" de los ARN de la composición activa inmunoestimuladora en la vacuna como se define arriba puede seleccionarse también dependiendo del tipo de ARN, por ejemplo monocistrónico, bi- o incluso multicistrónico, ya que un ARN bi- o incluso multicistrónico puede conducir a una expresión significativamente mayor de los antígenos codificados que el uso de una cantidad igual de un ARN monocistrónico. Una "cantidad segura y efectiva" de los ARN de la composición activa inmunoestimuladora como se define arriba que está contenida en la vacuna de la invención también variará en relación con la condición particular a tratar y también con la edad y la condición física del paciente, la severidad de la condición, la duración del tratamiento, la naturaleza de la terapia acompañante, del vehículo farmacéuticamente aceptable particular empleado y factores similares dentro del conocimiento y experiencia del doctor. La vacuna según la invención puede usarse de
 35 acuerdo con la invención para humanos y también con propósitos médicos veterinarios, como una composición farmacéutica o como una vacuna.

La vacuna según la invención típicamente contiene un vehículo farmacéuticamente aceptable. La expresión "vehículo farmacéuticamente aceptable" como se usa aquí preferiblemente incluye la
 40 base líquida o no líquida de la vacuna de la invención. Si la vacuna de la invención se provee en forma de líquido, el vehículo típicamente será agua libre de pirógenos; soluciones salinas isotónicas o tamponadas (acuosas), por ejemplo soluciones tampón fosfato, citrato, etc. En particular para la inyección de la vacuna de la invención, puede usarse agua o preferiblemente un tampón, muy preferiblemente un tampón acuoso que contiene una sal de sodio, preferiblemente al menos 50 mM de una sal sódica, 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 un aspecto preferido, las sales de sodio, calcio y opcionalmente potasio pueden estar presentes en forma de sus haluros, por ejemplo cloruro, yoduro o bromuro, en forma de sus hidróxidos, carbonatos, bicarbonatos o sulfatos, etc. Sin ser limitativos, ejemplos de sales de sodio son NaCl, NaI, NaBr, Na₂CO₃, NaHCO₃, Na₂SO₄, ejemplos de sales de potasio opcionales incluyen por ejemplo KCl, KI, KBr, K₂CO₃, KHCO₃, K₂SO₄ y ejemplos de sales de calcio incluyen CaCl₂, CaI₂, CaBr₂, CaCO₃, CaSO₄, Ca(OH)₂. Además, en el tampón puede estar presentes aniones orgánicos de los cationes mencionados. De conformidad con un aspecto más preferente, el tampón adecuado para propósitos de inyección como se define arriba puede contener sales seleccionadas de cloruro de
 55 sodio (NaCl), cloruro de calcio (CaCl₂) y opcionalmente cloruro de potasio (KCl), donde pueden estar presentes otros aniones además de cloruros. El CaCl₂ también puede reemplazarse por otra

sal tipo KCl. Típicamente, las sales en el tampón de inyección están presentes en una concentración de al menos 50 mM de cloruro de sodio (NaCl), al menos 3 mM de cloruro de potasio (KCl) y al menos 0,01 mM cloruro de calcio (CaCl₂). El tampón de inyección puede ser hipertónico, isotónico o hipotónico en relación al medio de referencia específico, es decir el tampón puede tener un contenido de sal más elevado, idéntico o más bajo en relación al medio de referencia específico, donde preferiblemente puede emplearse las concentraciones de las sales antes mencionadas que no provocan daño celular debido a ósmosis u otros efectos de la concentración. Medios de referencia son por ejemplo medios de uso *'in vivo'* líquidos como sangre, linfa, líquidos citosólicos u otros líquidos corporales, o por ejemplo líquidos que pueden usarse como medios de referencia en métodos *in vitro*, como tampones o líquidos. Dichos tampones o líquidos comunes son conocidos de los expertos en la técnica. La solución Ringer-Lactato es particularmente preferida como base líquida.

Sin embargo, también pueden usarse una o más cargas sólidas o líquidas o diluyentes o compuestos encapsuladores compatibles adecuados para la administración a una persona. El término "compatible" como se usa aquí significa que los constituyentes de la vacuna de la invención son capaces de mezclarse con los ARN de la composición activa inmunoestimuladora, que codifica para al menos cinco antígenos como se define arriba, de manera que no se produce una interacción que reduzca sustancialmente la efectividad farmacéutica de la vacuna de la invención bajo las condiciones de uso típicas. Los vehículos farmacéuticamente aceptables, las cargas y diluyentes deben, por supuesto, tener una pureza lo suficientemente alta y una toxicidad lo suficientemente baja para ser adecuados para la administración a una persona a tratar. Ejemplos de compuestos que pueden usarse como vehículos farmacéuticamente aceptables, cargas o constituyentes de los mismos son azúcares, por ejemplo 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 en polvo; malta; gelatina; sebo; glidantes sólidos, por ejemplo ácido esteárico, estearato de magnesio; sulfato de calcio; aceites vegetales, por ejemplo aceite de cacahuate, aceite de semilla de algodón, aceite de sésamo, aceite de oliva, aceite de maíz y aceite de teobroma; polioles, por ejemplo polipropilenglicol, glicerol, sorbitol, manitol y polietilenglicol; ácido algínico.

La selección del vehículo farmacéuticamente aceptable se determina en principio por la manera en la que se administra la vacuna de la invención. La vacuna de la invención puede administrarse, por ejemplo, sistémica o localmente. Las vías de la administración sistémica en general 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 y también inyección intradérmica, transdérmica, subcutánea o intramuscular o intralesional, intracraneal, intrapulmonar, intracardial y sublingual. Más preferiblemente, las vacunas pueden administrarse vía intradérmica, subcutánea o intramuscular. Por tanto, las composiciones/vacunas preferiblemente se formulan en forma líquida o sólida. La cantidad adecuada de vacuna de la invención a ser administrada puede determinarse por experimentos de rutina con modelos de animales. Dichos modelos incluyen, pero no se limitan a, conejos, ovejas, ratones, ratas, perros y modelos de primates no humanos. Las formas de dosis preferidas para la inyección incluyen soluciones estériles en agua, salino fisiológica o mezclas de las mismas. El pH de dichas soluciones deberá ajustarse a alrededor de 7,4. Vehículos adecuados para la inyección incluyen hidrogeles, dispositivos de liberación controlada o prolongada, ácido poliláctico y matrices de colágeno. Vehículos farmacéuticamente aceptables adecuados para la aplicación tópica incluyen aquellos adecuados para usarse en lociones, cremas, geles y similares. Si la vacuna de la invención debe administrarse peroralmente, la forma de dosis unitaria preferentes son pastillas, cápsulas y similares. Los vehículos farmacéuticamente aceptables para la preparación de las formas de dosis unitaria que pueden usarse para la administración oral son bien conocidos en la técnica. La selección de éstos depende de consideraciones secundarias, tales como sabor, coste y almacenaje, que no son críticos para los propósitos de la presente invención y pueden hacerse sin dificultad por un experto en la técnica.

La vacuna de la invención puede contener adicionalmente una o más sustancias auxiliares con el fin de aumentar más la inmunogenicidad. Una acción sinérgica de los ARN de la composición activa inmunoestimuladora como se define arriba y de una sustancia auxiliar, que puede estar contenida opcionalmente en la vacuna de la invención como se describe antes, se logra preferiblemente de esa manera. Dependiendo de los diversos tipos de sustancias auxiliares, diversos mecanismos pueden entrar en consideración a este respecto. Por ejemplo, los compuestos que permiten la maduración de células dendríticas (DCs), por ejemplo lipopolisacáridos, TNF- alfa o ligando CD40, forman una primera clase de sustancias auxiliares adecuadas. En general, es posible usar como sustancia auxiliar cualquier agente que influya en el sistema inmune de la forma "señal de peligro" (LPS, GP96, etc.) o citocinas, como GM-CFS, que permiten una respuesta inmune producida por el adyuvante de estimulación inmune según la invención que será aumentado y/o influenciado de manera dirigida. Sustancias auxiliares particularmente preferidas son citocinas, como monocinas, linfoquinas, interleucinas o quemoquinas, que – adicional a la inducción de la respuesta inmune adaptativa por los al menos dos antígenos codificados – promueven la respuesta inmune 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, INF-alfa, IFN-beta, INF-gamma, GM-CSF, G-CSF, M-CSF, LT-beta o TNF-alfa, factores de crecimiento, tales como hGH.

Otros aditivos que pueden incluirse en la vacuna de la invención son emulsificantes, por ejemplo Tween®; agentes humectantes, por ejemplo laurilsulfato de sodio; agentes colorantes; agentes saborizantes, vehículos farmacéuticos; agentes formadores de tabletas; estabilizadores; antioxidantes; conservantes.

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

Otra clase de compuestos que pueden agregarse a una vacuna de la invención en este contexto pueden ser ácidos nucleicos CpG, en particular CpG-ARN o CpG-ADN. Un CpG-ARN o CpG-Y puede ser un CpG-ADN de cadena individual (ss CpG-ADN), un CpG-ADN de cadena doble (dsADN), un CpG-ARN de cadena individual (ss CpG-RNA) o un CpG-ARN de cadena doble (ds CpG-RNA). El ácido nucleico CpG está preferiblemente en forma de CpG-ARN, más preferiblemente en forma de CpG-ARN de cadena individual (ss CpG-ARN). El ácido nucleico CpG preferiblemente contiene al menos una o más secuencias (mitogénicas) de dinucleótidos citosina/guanina (motivo(s) CpG). De acuerdo con una primera alternativa preferente, al menos un motivo CpG contenido en estas secuencias, es decir C (citosina) y 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. Sin embargo, de acuerdo con otra alternativa preferida, la C (citosina) y la G (guanina) del motivo CpG también pueden presentarse en forma metilada.

De acuerdo con otro objetivo preferente de la presente invención, la composición activa inmunoestimuladora inventiva o los ARN que codifican al menos cinco antígenos diferentes como se definen aquí pueden usarse (para la preparación de una vacuna según la presente invención) para el tratamiento de cáncer pulmonar de células no pequeñas (NSCLC), preferiblemente condiciones relacionadas con los tres principales subtipos de cáncer pulmonar de células no pequeñas (NSCLC) incluyendo, sin limitarse a, carcinoma pulmonar de células escamosas, adenocarcinoma y carcinoma pulmonar de células grandes. Se describe que la composición inmunoestimuladora según la invención puede emplearse para el tratamiento del cáncer de pulmón.

De acuerdo con otro objeto preferente de la presente invención, la vacuna de la invención o los ARN que codifican al menos cinco antígenos diferente como se definen aquí pueden emplearse para el tratamiento de cáncer de pulmón de células no pequeñas (NSCLC), preferiblemente en relación a los tres principales subtipos de cáncer pulmonar de células no pequeñas (NSCLC) incluyendo, sin

limitarse a, carcinoma pulmonar de células escamosas, adenocarcinoma y carcinoma pulmonar de células grandes.

Un aspecto no reivindicado se basa en métodos para el tratamiento del cáncer pulmonar, preferiblemente de una condición relacionada con el cáncer pulmonar de células no pequeñas (NSCLC), más preferiblemente de condiciones relacionadas con los tres principales subtipos de cáncer pulmonar de células no pequeñas (NSCLC) incluyendo, sin limitarse a, carcinoma pulmonar de células escamosas, adenocarcinoma y carcinoma pulmonar macrocítico, mediante la administración a un paciente que lo necesite de una cantidad farmacéuticamente efectiva de una vacuna de la invención o de una cantidad farmacéuticamente efectiva de una composición activa inmunoestimuladora de la invención. Dicho método típicamente comprende un primer paso opcional para preparar la composición activa inmunoestimuladora o la vacuna de la invención y un segundo paso que consiste en administrar (una cantidad farmacéuticamente efectiva de) dicha composición activa inmunoestimuladora de la invención o dicha vacuna de la invención a un paciente que lo necesite. Un paciente que lo necesite típicamente se seleccionará de cualquier mamífero. En el contexto de la presente invención, un mamífero se selecciona preferiblemente del grupo que consiste en, sin limitarse a, por ejemplo, cabra, ganado, cerdo, perro, gato, burro, simio, roedores tales como ratón, hámster, conejo y, particularmente, humanos, donde el mamífero típicamente sufre de cáncer pulmonar, preferiblemente de una condición relacionada con cáncer pulmonar de células no pequeñas (NSCLC), más preferiblemente de condiciones relacionadas con los tres principales subtipos de cáncer pulmonar de células no pequeñas (NSCLC), incluyendo, sin limitarse a, carcinoma pulmonar de células escamosas, adenocarcinoma y carcinoma pulmonar macrocítico o una condición relacionada con los mismos.

La invención se refiere también al uso de la composición activa inmunoestimuladora de la invención o de los al menos cinco ARN que codifican los al menos cinco antígenos diferentes como se definen en la reivindicación 1 para la preparación de una vacuna, preferiblemente para provocar una respuesta inmune en un mamífero, para el tratamiento del cáncer pulmonar de células no pequeñas (NSCLC).

De igual forma, la invención se refiere al uso de la vacuna de la invención *per se* o de los al menos cinco ARN que codifican para al menos cinco antígenos diferentes como se definen aquí para su uso en un método para provocar una respuesta inmune adaptativa en un mamífero, para el tratamiento del cáncer pulmonar de células no pequeñas (NSCLC).

La prevención o tratamiento del cáncer pulmonar de células no pequeñas (NSCLC) se debe al uso de la composición activa inmunoestimuladora y/o de la vacuna de la invención, que se administra de una sola vez o de forma escalonada, por ejemplo como un kit de partes, cada parte conteniendo al menos un antígeno preferiblemente diferente. Para la administración, preferiblemente puede emplearse cualquiera de las vías de administración antes definidas. Por ejemplo, la composición activa inmunoestimuladora y/o la vacuna según la invención puede emplearse para tratar el cáncer pulmonar de células no pequeñas (NSCLC), induciendo o incrementando una respuesta inmune adaptativa en la base a los al menos cinco antígenos codificados por los al menos cinco ARN de la composición activa inmunoestimuladora de la invención. La administración de la composición activa inmunoestimuladora de la invención y/o de la vacuna de la invención puede producirse antes, durante o tras la administración de otra composición activa inmunoestimuladora y/o vacuna de la invención como se definen aquí que puede contener otra combinación de ARN que codifican para diferentes antígenos, donde cada antígeno codificado por el al menos un ARN de la composición activa inmunoestimuladora de la invención es preferiblemente adecuado para su uso en el tratamiento del cáncer pulmonar de células no pequeñas (NSCLC).

De conformidad otra realización, la presente invención también comprende el uso de la composición activa inmunoestimuladora como se define en la reivindicación 1 para la preparación de una vacuna para modular, preferiblemente inducir o incrementar, una respuesta inmune en un mamífero como se define arriba, para el tratamiento del NSCLC como se define aquí. En este contexto, el uso para el tratamiento del NSCLC como se define aquí puede favorecerse por cualquier combinación de un tratamiento convencional de cáncer pulmonar, en especial NSCLC como se define aquí, como

5 terapia de radiación, quimioterapia, terapia de protones, terapia hormonal, terapia de anticuerpos, terapias adyuvantes, terapias que incluyen otras vacunas distintas a la vacuna de la invención, terapias que incluyen inhibidores de cinasa o pequeños nucleótidos, o combinaciones de las mismas, y una terapia empleando la composición activa inmunoestimuladora de la invención o la vacuna de la invención como se define aquí.

10 La administración de la composición activa inmunoestimuladora de la invención o de los ARN que codifican para al menos cinco antígenos diferentes como se definen en la reivindicación 1 o la correspondiente vacuna puede llevarse a cabo en un tratamiento programado escalonado. Un tratamiento programado escalonado puede ser, por ejemplo, la administración de la composición activa inmunoestimuladora de la invención o de los al menos cinco ARN que codifican los antígenos como se definen aquí o la vacuna de la invención anterior, durante y/o después de una terapia de NSCLC, por ejemplo por administración de la composición activa inmunoestimuladora de la invención o la vacuna antes, durante y/o tras un tratamiento o una administración de un terapéutico adecuado para el tratamiento del NSCLC como se define aquí. Dicho tratamiento escalonado en el tiempo puede realizarse usando, por ejemplo, un kit, preferiblemente un kit de partes como se define más abajo.

20 El tratamiento escalonado en el tiempo puede comprender adicional o alternativamente la administración de la composición activa inmunoestimuladora de la invención o la vacuna, preferiblemente de los al menos cinco ARN que codifican al menos cinco antígenos diferentes como se definen en la reivindicación, en una forma en que los al menos cinco ARN que codifican para al menos cinco antígenos diferentes como se definen arriba, preferiblemente formando parte de la composición activa inmunoestimuladora de la invención o de la vacuna, se administran paralela, anterior o posteriormente a otro. Preferiblemente, la administración (de todos los al menos cinco ARN) ocurre dentro de una hora, más preferiblemente en un lapso de 30 minutos, incluso más preferiblemente dentro de un lapso de 15, 10, 5, 4, 3, o 2 minutos o incluso en 1 minuto. Dicho tratamiento escalonado en el tiempo puede realizarse usando por ejemplo un kit, preferiblemente un kit de partes como se define más abajo.

30 De acuerdo con una realización final, la presente invención también proporciona kits, particularmente kits de partes, que comprenden la composición activa inmunoestimuladora de la invención y/o la vacuna de la invención y opcionalmente instrucciones técnicas con información sobre la administración y la dosis de la composición activa inmunoestimuladora y/o la vacuna de la invención. Las instrucciones técnicas pueden contener información acerca de la administración y dosis de la composición activa inmunoestimuladora de la invención y/o la vacuna de la invención. Dichos kits, preferiblemente kits de partes, pueden aplicarse por ejemplo para cualquiera de las aplicaciones o usos antes mencionados, preferiblemente para el uso de al menos una composición activa inmunoestimuladora de la invención (para la preparación de la vacuna de la invención) para el tratamiento del NSCLC como se define aquí. Los kits también pueden aplicarse para el uso de la al menos una composición activa inmunoestimuladora de la invención (para la preparación de la vacuna de la invención) para el tratamiento del NSCLC como se define aquí, donde la composición activa inmunoestimuladora de la invención y/o la vacuna, debido a los al menos cinco antígenos codificados, pueden ser capaces de inducir o aumentar una respuesta inmune en un mamífero como se define arriba. Dichos kits también pueden aplicarse para el uso de al menos una composición activa inmunoestimuladora de la invención (para la preparación de la vacuna de la invención) para modular, preferiblemente para provocar, por ejemplo inducir o incrementar, una respuesta inmune en un mamífero como se define arriba y preferiblemente para apoyar el tratamiento del NSCLC. Los kits de partes, como una forma especial de kits, pueden contener una o más composiciones activas inmunoestimuladoras 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 una (por ejemplo una) composición activa inmunoestimuladora de la invención, una (por ejemplo una) vacuna de la invención. Los kits que comprenden al menos cinco ARN que codifican al menos cinco antígenos como se define en la reivindicación 1 en partes diferentes del kit, por ejemplo cada parte del kit contiene al menos un ARN que codifica un antígeno diferente, también se contemplan en la invención. De forma adicional, es posible una combinación de ambos tipos de kits de partes. Los kits de partes pueden usarse, por ejemplo, cuando se contempla un tratamiento escalonado en el

tiempo, por ejemplo cuando se usan diferentes formulaciones y/o concentraciones crecientes de la composición activa inmunoestimuladora de la invención, la vacuna de la invención y/o los al menos cinco ARN que codifican al menos cinco antígenos como se definen arriba durante el mismo tratamiento *in vivo*. Los kits de partes también pueden usarse cuando se contempla o se necesita una formulación o administración por separado de los ARN que codifican los diferentes antígenos de la composición activa inmunoestimuladora (es decir en partes) (por ejemplo, por razones técnicas), pero por ejemplo, todavía deberá lograrse una presencia combinada de los ARN que codifican los diferentes antígenos *in vivo*. En particular, se contemplan kits de partes como una forma especial de kits donde cada parte del kit contiene al menos un ARN que codifica un antígeno diferente como se define anteriormente, todas las partes del kit de partes preferiblemente formando la composición activa inmunoestimuladora de la invención o la vacuna de la invención como se define aquí. Dichos kits de partes específicos pueden ser particularmente adecuados, por ejemplo, si diferentes ARN que codifican antígenos se formulan por separado como partes diferentes de los kits, pero después se administran juntos o de manera escalonada en el tiempo al mamífero que lo necesite. En el último caso, la administración de todas las partes diferentes de dicho kit típicamente se produce dentro de un límite corto de tiempo, de forma que todos los ARN que codifican los antígenos están presentes en el mamífero aproximadamente al mismo tiempo tras la administración de la última parte del kit. Cualquiera de los kits anteriores puede usarse en el tratamiento como se define anteriormente.

20 Ventajas de presente invención

La presente invención proporciona una composición activa inmunoestimuladora para el tratamiento del cáncer pulmonar de células no pequeñas (NSCLC), donde la composición comprende al menos cinco ARN, preferiblemente ARNm, que codifican cada uno un antígeno diferentes capaz de provocar una respuesta inmune (adaptativa) en un mamífero, donde los cinco antígenos se seleccionan del grupo consistente en 5T4, NY-ESO-1, Survivina, MAGE-C1 o MAGE-C2 como se define en la reivindicación 1. Dicha composición activa inmunoestimuladora permite un tratamiento eficiente del cáncer pulmonar de células no pequeñas (NSCLC) o un tratamiento complementario a uso de terapias convencionales. Además evita el problema de la propagación incontrolada de las secuencias de ADN introducidas por el uso de ARN como un enfoque para los métodos curativos. El ARN como se usa en la composición activa inmunoestimuladora de la invención tiene ventajas adicionales considerables sobre los sistemas de expresión de ADN por ejemplo, en respuestas inmunes, 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 de otra forma puede ser completa o parcialmente inactivado o dar pie a una pérdida de información. Además evita otros riesgos de usar ADN como agente para inducir una respuesta inmune (por ejemplo, como una vacuna), como la inducción de anticuerpos anti-ADN patogénicos en el paciente al que se la ha introducido el ADN extraño, y así obtener una respuesta inmune (posiblemente fatal). En contraste, no se han detectado anticuerpos anti-ARN.

FIGURAS

40 Las siguientes figuras pretenden ilustrar la invención aún más.

Figura 1: muestra una secuencia de ARN (SEQ ID NO: 1) (secuencia de inicio basada en el tipo silvestre) que codifica para MUC1 (HsMUC1 - 5xVNTR (la secuencia de tipo silvestre normalmente muestra 40 repeticiones en tándem. Estas fueron, por razones de clonación, reducidas a 5 repeticiones en tándem). Contenido de GC: 61,27%; longitud: 1668 pb).

45 Figura 2: muestra una secuencia de ARN estabilizada (GC) (SEQ ID NO: 2) que codifica para MUC1(HsMUC1 GC - 5xVNTR, 1. GC maximizado, 2. Uso de codón) contenido de GC: 73,56%; longitud 1668 pb. Diferencia a la secuencia básica (Fig. 1 (SEQ ID NO: 1)): 398 / 1668 bases = 23,86%.

- Figura 3: muestra una secuencia de ARN (SEQ ID NO: 3) (secuencia de inicio basada en el tipo silvestre) que codifica para 5T4 (Hs5T4 (glicoproteína de trofoblastos TPBG); contenido de GC: 61,60%; longitud: 1263 pb.
- 5 Figura 4: muestra una secuencia de ARN estabilizada (GC) (SEQ ID NO: 4) que codifica para 5T4 (Hs5T4 GC, 1. GC-maximizado, 2. Uso de codón); contenido de GC: 70,47%; longitud 1263 pb. Diferencia a la secuencia básica (Fig. 3 (SEQ ID NO: 3)): 247 / 1263 Bases = 19,56%.
- Figura 5: muestra una secuencia de ARN (SEQ ID NO: 5) (secuencia de inicio basada en el tipo silvestre) que codifica para Her-2/neu (HsHer2/neu (homólogo 2 del oncogén viral de leucemia eritroblástica v-erb-b2); contenido de GC: 60,78%; longitud: 3768 pb.
- 10 Figura 6: muestra una secuencia de ARN estabilizada (GC) (SEQ ID NO: 6) que codifica para Her-2/neu (HsHer2/neu GC, 1. GC-maximizado, 2. Uso de codón); contenido de GC: 70,54%; longitud 3768 pb. Diferencia a la secuencia básica (Fig. 5 (SEQ ID NO: 5)): 772 / 3768 Bases = 20,49%.
- 15 Figura 7: muestra una secuencia de ARN (SEQ ID NO: 7) (secuencia de inicio basada en el tipo silvestre) que codifica para hTERT (HsTERT (transcriptasa inversa telomerasa); contenido de GC: 66,08%; longitud: 3399 pb.
- Figura 8: muestra una secuencia de ARN estabilizada (GC) (SEQ ID NO: 8) que codifica para hTERT (HsTERT GC, 1. GC-maximizado, 2. Uso de codón); contenido de GC: 72,96%; longitud 3399 pb, Diferencia a la secuencia básica (Fig. 7 (SEQ ID NO: 7)): 566 / 3399 Bases = 16,65%.
- 20 Figura 9: muestra una secuencia de ARN (SEQ ID NO: 9) (secuencia de inicio basada en el tipo silvestre) que codifica para WTI (HsWTI tumor Wilms 1)); contenido de GC: 61,78%; longitud: 1554 pb.
- Figura 10A: muestra una secuencia de ARN (SEQ ID NO: 10) que codifica para WT1 (HsWTI (tumor Wilms 1)) que muestra una secuencia con un contenido de GC reducido en la región 325-408 de dicha secuencia en comparación con la región correspondiente de la secuencia del tipo silvestre. Las figuras 10 B, 10 C y 10 D muestran una comparación de las regiones correspondientes 325-408: en la Fig. 10 B la secuencia de tipo silvestre de conformidad con la figura 9 (SEQ ID NO: 9), en la Fig. 10 C la secuencia GC maximizada de acuerdo con la figura 11 (SEQ ID NO: 11), y en la Fig. 10 D la secuencia GC reducida de acuerdo con la fig. 10 A (SEQ ID NO: 10), las cuales muestran un patrón de GC diferente.
- 25 30
- Figura 11: muestra una secuencia de ARN estabilizada (GC) (SEQ ID NO: 11) que codifica para WT1 (HsWTI GC, 1. GC-maximizado, 2. Uso de codón); Contenido de GC: 72,59%; Longitud 1554 pb. Diferencia a la secuencia básica (Fig. 9 (SEQ ID NO: 9)): 322 / 1554 Bases = 20,72%.
- 35 Figura 12: muestra una secuencia de ARN (SEQ ID NO: 12) (secuencia de inicio basada en el tipo silvestre) que codifica para CEA (CEA antígeno carcinoembrionario) (HsCEACAM5); contenido de GC: 52,20%; longitud: 2109 pb.
- Figura 13: muestra una secuencia de ARN estabilizada (GC) (SEQ ID NO: 13) que codifica para CEA (CEACAM5 GC, 1. GC-maximizado, 2. Uso de codón); Contenido de GC: 66,24%; Longitud 2109 pb. Diferencia a la secuencia básica (Fig. 12 (SEQ ID NO: 12)): 495 / 2109 Bases = 23,47%.
- 40
- Figura 14: muestra una secuencia de ARN (SEQ ID NO: 14) (secuencia de inicio basada en el tipo silvestre) que codifica para MAGE-A2 (HsMAGE-A2 (familia de antígeno de melanoma A, 2) HsMAGE-A2B); contenido de GC: 55,87%; longitud: 945 pb.
- Figura 15: muestra una secuencia de ARN estabilizada (GC) (SEQ ID NO: 15) que codifica para MAGE- A2 (HsMAGE-A2B GC, 1. GC-maximizado, 2. Uso de codón); Contenido de GC:
- 45

68,57%; Longitud 945 pb. Diferencia a la secuencia básica (Fig. 14 (SEQ ID NO: 14)): 187 / 945 Bases = 19,79%.

5 Figura 16: muestra una secuencia de ARN (SEQ ID NO: 16) (secuencia de inicio basada en el tipo silvestre) que codifica para MAGE-A3 (MAGE-A3 (familia de antígeno de melanoma A, 3) MAGE-A3); contenido de GC: 56,30%; Longitud: 945 pb.

Figura 17: muestra una secuencia de ARN estabilizada (GC) (SEQ ID NO: 17) que codifica para MAGE- A3 (MAGE-A3 GC, 1.GC-maximizado, 2. Uso de Codón, ya conocido GC-enriquecimiento); Contenido de GC: 69,00%; Longitud 945 pb. Diferencia a la secuencia básica (Fig. 16 (SEQ ID NO: 16)): 190 / 945 Bases = 20,11%.

10 Figura 18: muestra una secuencia de ARN (SEQ ID NO: 18) (secuencia de inicio basada en el tipo silvestre) que codifica para Survivina (Survivina (baculoviral IAP repetición que contiene 5, BIRC5) HsSurvivin(wt)); Contenido de GC: 52,68%; Longitud: 429 pb.

15 Figura 19: muestra una secuencia de ARN estabilizada (GC) (SEQ ID NO: 19) que codifica para Survivina (HsSurvivin(GC), 1. GC-maximizado, 2. Uso de Codón, ya conocido GC-enriquecimiento); Contenido de GC: 65,27%; Longitud: 429 pb. Diferencia a la secuencia básica (Fig. 18 (SEQ ID NO: 18)): 72 / 429 Bases = 16,78%.

Figura 20: muestra una secuencia de ARN (SEQ ID NO: 20) (secuencia de inicio basada en el tipo silvestre) que codifica para NY-ESO-1 (Homo sapiens NY-ESO-1 (N Y-ESO- 1 (wt)); Contenido de GC 67,4%.

20 Figura 21: muestra una secuencia de ARN estabilizada (GC) (SEQ ID NO: 21) que codifica para NY- ESO-1 (NY-ESO-1 (GC), Contenido de GC 79,56%, (ya conocido GC- enriquecimiento); Diferencia a wt (Fig. 20 (SEQ ID NO: 20)): 112/543 Bases, 20,63%.

25 Figura 22: muestra una secuencia de ARN (SEQ ID NO: 22) (secuencia de inicio basada en el tipo silvestre) que codifica para MAGE-C1 (HsMAGEC1 (familia de antígeno de melanoma C, 1) HsMAGEC1 (wt)) Contenido de GC: 51,86%; Longitud: 3429 pb.

Figura 23: muestra una secuencia de ARN estabilizada (GC) (SEQ ID NO: 23) que codifica para MAGE- C1 (HsMAGEC1 (GC), 1. GC-maximizado, 2. Uso de Codón). Contenido de GC: 68,73%; Longitud 3429 pb. Diferencia a la secuencia básica (Fig. 22 (SEQ ID NO: 22)): 964 / 3429 Bases =28,11%

30 Figura 24: muestra una secuencia de ARN estabilizada (GC) (SEQ ID NO: 24) que codifica para MAGE-C1 truncado (HsMAGEC1 (GC), 1. GC-maximizado, 2. Uso de Codón). En comparación con la secuencia básica (Fig. 22 (SEQ ID NO: 22)) las regiones de repetición se borraron y la secuencia de conformidad con la figura 24, que sigue un codón de partida inicial (ATG), comienza en aa 613 de la secuencia de tipo silvestre de GC-maximizado (Fig. 23 (SEQ ID NO: 23)).

35 Figura 25: muestra una secuencia de ARN (SEQ ID NO: 25) (secuencia de inicio basada en el tipo silvestre) que codifica para MAGE-C2 (HsMAGE-C2 (familia de antígeno de melanoma C, 2)HsMAGE-C2); Contenido de GC: 50,81%; Longitud: 1122 pb.

40 Figura 26: muestra una secuencia de ARN estabilizada (GC) (SEQ ID NO: 26) que codifica para MAGE- C2 (HsMAGE-C2 GC, 1. GC-maximizado, 2. Uso de Codón); Contenido de GC: 66,58%; Longitud 1 122 pb, Diferencia a la secuencia básica (Fig. 25 (SEQ ID NO: 25)): 264 / 1122 Bases =23,53%.

45 Figura 27: muestra la presencia de anticuerpos IgG1 específicos para el antígeno tumoral NY-ESO-1 en ratones que fueron vacunados con la vacuna de ARNm que consiste de 5 componentes, cada uno conteniendo ARNm que codifica para un antígeno relacionado con NSCLC (NY-ESO-1, MAGE-C1 , MAGE-C2, Survivina y 5T4) formulado con protamina a una proporción en masa 4:1 .

- Figura 28: muestra la presencia de anticuerpos IgG2a específicos para el antígeno tumoral NY-ESO-1 en ratones que fueron vacunados con la vacuna de ARNm que consiste de 5 componentes, cada uno conteniendo ARNm que codifica para un antígeno relacionado con NSCLC (NY-ESO-1, MAGE-C1 , MAGE-C2, Survivina y 5T4) formulado con protamina a una proporción en masa 4:1.
- 5 Figura 29: muestra la presencia de anticuerpos IgG1 específicos para el antígeno tumoral MAGE-C1 en ratones que fueron vacunados con la vacuna de ARNm que consiste de 5 componentes, cada uno conteniendo ARNm que codifica para un antígeno relacionado con NSCLC (NY-ESO-1 , MAGE-C1 , MAGE-C2, Survivina y 5T4) formulado con protamina a una proporción en masa 4:1.
- 10 Figura 30: muestra la presencia de anticuerpos IgG2a específicos para el antígeno tumoral MAGE-C1 en ratones que fueron vacunados con la vacuna de ARNm que consiste de 5 componentes, cada uno conteniendo ARNm que codifica para un antígeno relacionado con NSCLC (NY-ESO-1 , MAGE-C1 , MAGE-C2, Survivina y 5T4) formulado con protamina a una proporción en masa 4:1.
- 15 Figura 31: muestra la presencia de anticuerpos IgG1 específicos para el antígeno tumoral MAGE-C2 en ratones que fueron vacunados con la vacuna de ARNm que consiste de 5 componentes, cada uno conteniendo ARNm que codifica para un antígeno relacionado con NSCLC (NY-ESO-1 , MAGE-C1 , MAGE-C2, Survivina y 5T4) formulado con protamina a una proporción en masa 4:1.
- 20 Figura 32: muestra la presencia de anticuerpos IgG2a específicos para el antígeno tumoral MAGE-C2 en ratones que fueron vacunados con la vacuna de ARNm que consiste de 5 componentes, cada uno conteniendo ARNm que codifica para un antígeno relacionado con NSCLC (NY-ESO-1, MAGE-C1, MAGE-C2, Survivina y 5T4) formulado con protamina a una proporción en masa 4:1 .
- 25 Figura 33: muestra la inducción de linfocitos T específicos de antígenos dirigidos al antígeno tumoral 5T4 en ratones que fueron vacunados con la vacuna de ARNm que consiste de 5 componentes, cada uno conteniendo ARNm que codifica para un antígeno relacionado con NSCLC (NY-ESO-1, MAGE-C1, MAGE-C2, Survivina y 5T4) formulado con protamina a una proporción en masa 4:1.
- 30 Figura 34: muestra la inducción de linfocitos T específicos de antígenos dirigidos al antígeno tumoral NY-ESO-1 en ratones que fueron vacunados con la vacuna de ARNm que consiste de 5 componentes, cada uno conteniendo ARNm que codifica para un antígeno relacionado con NSCLC (NY-ESO-1, MAGE-C1, MAGE-C2, Survivina y 5T4) formulado con protamina a una proporción en masa 4:1.
- 35 Figura 35: Tabla de adyuvantes.

Ejemplos

Los siguientes ejemplos pretenden ilustrar la invención aún más.

1. Preparación de plásmidos de codificación:

40 Las siguientes secuencias de ADN experimentales, correspondientes a las secuencias de ARNm respectivas y codificando para los antígenos

- hTERT,
- WT1,
- MAGE-A2,
- 5T4,
- 45 • MAGE-A3,
- MUC1,

- Her-2/neu,
- NY-ESO-1,
- CEA,
- Survivina,
- MAGE-C 1, o
- MAGE-C2.

5

respectivamente, se prepararon y usaron para los experimentos de transcripción y transfección *in vitro*. Así, la secuencia de ADN correspondiente al antígeno nativo que codifica para el ARNm se incrementó en su contenido GC y se optimizó en codones. Entonces, la secuencia codificadora se transfirió a un constructo ARNactivo (CureVac GmbH, Tubingen, Alemania), que se modificó con una etiqueta poli-A y una etiqueta poli-C (A70-C30).

10

2. Transcripción *in vitro*:

En base al ADN plásmido recombinante obtenido en el Ejemplo 1, las secuencias de ARN se prepararon por transcripción *in vitro*. Así, el ADN de plásmido recombinante se linealizó y posteriormente se transcribió *in vitro* usando ARN polimerasa T7. El patrón de ADN se degradó entonces por digestión con ADNasa I y el ARN se recuperó por precipitación con LiCl y después se limpió por extracción con CLAR (PUREMessenger®, CureVac GmbH, Tubingen, Alemania).

15

3. Complejación con protamina

Para la transfección del ARN en células y organismos, el ARN obtenido mediante transcripción *in vitro* referiblemente se complejó, muy preferiblemente con protamina, mezclando el ARN con protamina.

20

4. Experimentos de vacunación

Para la vacunación, el ARN obtenido en el experimento de transcripción *in vitro* que se muestra abajo (véase Experimento 2) se transfectó en ratones (Ratones: C57 BL/6), preferiblemente complejado con protamina (véase Experimento 3). La transfección ocurrió en diferentes grupos, en los que 5 ratones (C57 BL/6) por grupo se inmunizaron intradérmicamente 8 veces en un lapso de 3 semanas con el cóctel del ARNm de la invención, esto es una mezcla de ARNm complejado con protamina donde el ARN codifica para al menos dos de los antígenos hTERT, WT1, MAGE-A2, 5T4, MAGE-A3, MUC1, Her-2/neu, NY-ESO-1, CEA, Survivina, MAGE-C1, o MAGE-C2.

25

30 5. Detección de una respuesta inmune específica a antígeno (respuesta inmune a células B):

La detección de una respuesta inmune específica a antígeno (respuesta inmune a células B) se llevó a cabo detectando anticuerpos específicos de antígenos. Así, se tomaron muestras de sangre de los ratones vacunados una semana después de la última vacunación y se preparó el suero. Se recubrieron placas MaxiSorb (Nalgene Nunc International) con la proteína antigénica tal como la codifica el cóctel de ARNm (0,5 µg/pozo). Después de bloquear con 1xPBS que contiene 0,05% Tween-20 y 1% BSA, las placas se incubaron con suero de ratón diluido (1:30, 1:90, 1:270, 1:810). Posteriormente se agregó un anticuerpo secundario acoplado con biotina (Anti-ratón-IgG2a Pharmingen). Después de lavar, la placa se incubó con peroxidasa-estreptavidina de rábano y posteriormente se midió la conversión del sustrato de ABTS (2,2'-azino-bis(ácido 3-etilbenzotiazolin-6-sulfónico).

35

40

6. Detección de una respuesta inmune celular específica de antígeno (respuesta inmune de células T) por ELISPOT:

Dos semanas después de la última vacunación se sacrificaron a los ratones, se les retiró el bazo y se aislaron los esplenocitos. Los esplenocitos se reestimularon durante 7 días en presencia de péptidos de los antígenos anteriores (biblioteca de péptidos) o se co-incubaron con células dendríticas generadas a partir de células de médula ósea de ratones singénicos nativos, que se electroporaron con ARN que codifica para el antígeno. Para determinar una respuesta inmune

45

celular específica a antígenos, se midió la secreción INFgamma después de la reestimulación. Para la detección de INFgamma se incubó una placa multipantalla (Millipore) durante la noche con tampón de recubrimiento 0,1 M de carbonato-bicarbonato, pH 9,6, 10,59 g/l Na₂CO₃, 8,4g/l NaHCO₃) que comprende un anticuerpo contra INFγ (BD Pharmingen, Heidelberg, Alemania). Los
 5 estimulantes y células efectoras se incubaron juntas en la placa en una proporción 1:20 durante 24h. La placa se lavó con 1xPBS y se incubó con un anticuerpo secundario acoplado a biotina. Después de lavar con 1xPBS/0,05% Tween-20, el sustrato (Fosfato de 5-Bromo-4-Cloro-3-Indolil/Sistema de Sustrato Líquido Azul de Nitrotetrazolio de Sigma Aldrich, Taufkirchen, Alemania) se agregó a la placa y la conversión del sustrato pudo detectarse visualmente.

10 7. Reto tumoral:

Inmunización:

Una semana después de la última inmunización, se inyectaron células de melanoma 1 Mio B16 o TRAMP-C1 subcutáneamente en los ratones. En un lapso de 2 semanas (B16) o 7 semanas (TRAMP-C1), respectivamente, se determinó el volumen del tumor.

15 8. Preparación de una vacuna de ARNm

Un ejemplo particular de la composición activa inmunoestimuladora de la invención, comprendiendo una combinación de varios antígenos para el uso como vacuna para el tratamiento del cáncer pulmonar de células no pequeñas (NSCLC) se preparó según la descripción anterior. La
 20 composición activa inmunoestimuladora de la invención consistía en 5 componentes, cada uno conteniendo un ARNm que codifica para un antígeno relacionado con NSCLC (NY-ESO-I , MAGE-C1 , MAGE-C2, Survivina y 5T4, de acuerdo con las secuencias SEQ ID NO: 4, 19, 21, 24 y 26 (secuencias enriquecidas con GC)) formuladas con protamina en una proporción en masa 4:1 .

Vacunación

Los ratones C57BL/6 se vacunaron vía intradérmica con la vacuna de ARNm consistente en 5
 25 componentes, cada uno conteniendo un ARNm que codifica para un antígeno relacionado con NSCLC (NY- ESO-1, MAGE-C1, MAGE-C2, Survivina y 5T4, de conformidad con las secuencias SEQ ID NO: 4, 19, 21, 24 y 26 (secuencias enriquecidas con GC)) formuladas con protamina (64 µg por antígeno por ciclo, dividido entre 4 inyecciones/ciclo). La vacunación de control se realizó usando las dosis totales correspondientes de ARN que codifican para LacZ (control ARNm lacZ). La
 30 vacunación comprendió tres ciclos de inmunización (semana 1, 3, y 5). Los grupos, número de ratones y cepas de ratones se indican en la siguiente tabla:

Grupos	Cepa de ratón	Número de ratones
Vacuna ARNm	C57BL/6	10 5 para Elispot y 5 para la detección de anticuerpos en suero por ELISA
Control ARNm lacZ	C57BL/6	5 3 para Elispot y los 5 para la detección de anticuerpos en suero por ELISA

Detección de anticuerpos específicos de antígenos

Seis días después de la última vacunación, se tomaron las últimas muestras de sangre (200 µl) vía
 35 retroorbital y se analizó el suero para la presencia de anticuerpos específicos de antígenos subtipos IgG1 y IgG2a usando ELISA. Las placas de 96 cavidades ELISA se recubrieron con proteína recombinante (10 µg/ml en tampón de recubrimiento, se incubaron a 37°C durante 4 h) y se bloquearon con tampón de bloqueo de 200 µl por cavidad durante la noche a 4°C. Posteriormente, las muestras se incubaron con suero colectado de cada grupo de ratones y se trituraron en

- 5 diluciones que varían de 1:3 a 1:48 durante 4 horas a temperatura ambiente. Después de la incubación con un anticuerpo específico (1:300 en tampón de bloqueo) contra IgG1 o IgG2a de ratón y la incubación con un anticuerpo secundario acoplado a HRP (1:500 en tampón de bloqueo), se agregó sustrato-TMB. La reacción colorimétrica se midió a 450 nm usando un lector ELISA (Tecan Deutschly GmbH, Crailsheim, Alemania).

ELISPOT

Para la detección de respuestas de T-linfocitos citotóxicos (CTL), el análisis de la secreción del efecto de citocina IFN- γ en respuesta a un estímulo específico puede visualizarse a un nivel celular individual usando la técnica ELISPOT.

- 10 Los esplenocitos de ratones vacunados con antígenos y control se aislaron 6 días después de la última vacunación y luego se transfirieron a placas ELISPOT de 96 pocillos recubiertas con un anticuerpo de captura anti-IFN- γ (10 μ g/ml). Después se estimularon las células durante 24 horas a 37°C ya sea con una librería de péptidos derivada de antígenos relevantes o con la librería derivada de VIH o el disolvente de péptidos, DMSO, o se incubaron en medio puro como control. Todas las
- 15 librerías se usaron a una concentración de 1 μ g/péptido/ml. Después del periodo de incubación, las células se lavaron de la placa y el IFN- γ secretado por las células se detectó usando un anticuerpo secundario biotinilado contra murina IFN- γ (1 μ g/ml), seguido de estreptavidina-AKP. Se visualizaron las manchas usando un sustrato BCIP/NBT y se contaron con un lector ELISPOT automatizado (Analizado Immunospot, CTL Analyzers LLC).

20 Análisis Estadístico

El análisis estadístico se llevó a cabo usando Graph Pad Prism 5.01 (GraphPad Software, Inc.). Todos los resultados se expresan como media (o mediana) \pm error estándar de la media.

- 25 Para los ensayos Elispot, debido al hecho de que la activación basal es fuertemente individual, se llevó a cabo una corrección por ratón mediante la sustracción del número de manchas en cavidades medianas de todos los otros valores. Se usaron pruebas Mann-Whitney de dos muestras para analizar la diferencia entre los grupos de prueba con un nivel de significancia del 5%.

Resultados y Discusión

- 30 Se vacunaron a los ratones con la vacuna de ARNm que contiene los cinco componentes como se define anteriormente, en particular ARNm enriquecidos con GC que codifican para los antígenos relacionados con NSCLC NY-ESO-1, MAGE-C2, MAGE-C1, Survivina y 5T4 (de acuerdo con las secuencias SEQ ID NO: 4, 19, 21, 24 y 26 (secuencias enriquecidas con GC)) cada una formulada por separado con la protamina de péptido catiónico en una proporción en masa 4:1. Los ratones de control se trataron con ARN irrelevante que codifica para LacZ formulado con protamina a la misma proporción que la vacuna de ARNm.

- 35 Utilizando suero aislado de la muestra de sangre de los ratones vacunados con el antígeno y de control, se ensayó la inducción de anticuerpos específicos en comparación con los antígenos. Para tres de las cinco proteínas analizadas, MAGE-C1, MAGE-C2 y NY-ESO-1, se detectaron anticuerpos específicos en suero de los ratones vacunados con la vacuna de ARNm, demostrando que los ARNm son funcionales e inmunogénicos *in vivo*. Las proteínas requeridas para la detección
- 40 de anticuerpos se produjeron en *E. coli*. Debido a que la producción de proteínas en *E. coli* puede influir en las modificaciones post-traduccionales y éstas no se describen adecuadamente para los antígenos que se usan, esto podría responder a la falta de respuesta observada para las proteínas restantes.

- 45 Seguidamente se analizó la activación de las células T citotóxicas como respuesta a la administración de la vacuna de ARNm. IFN- γ es el principal mediador de respuestas Th1 y es secretado por los CTL activados. Por tanto, se investigó la presencia de células T citotóxicas específicas de antígenos en esplenocitos de ratones vacunados usando la técnica ELISPOT. Como

estímulo antigénico para los esplenocitos, se usaron librerías de péptidos restringidos. Debido a que se desconocen los distintos epítopes de los antígenos humanos utilizados para los ratones MHC (H-2Kb y H-2Db en ratones C57BL/6), se tuvo que utilizar una selección hipotética de péptidos según la afinidad de unión potencial por búsqueda en la base de datos SYFPEITHI. De las librerías de péptidos (se traslapan 15meros con 11 aminoácidos) a lo largo de todas las secuencias de las proteínas, aquellos 15meros que contienen los epítopes hipotéticamente mejores se seleccionaron y agruparon hasta en un máximo de 18 péptidos. Sin embargo, estas selecciones podrían no contener necesariamente los epítopes correctos, por lo que la detección de las respuestas inmunes con ayuda de esas herramientas puede arrojar fácilmente resultados negativos falsos. No obstante, la estimulación con dos de estas librerías, que se originan de NY-ESO-1 y 5T4, conducen a una alta secreción de IFN- γ en los esplenocitos de ratones vacunados con la vacuna de ARNm y no en los esplenocitos de los ratones de control, vacunados con ARNm que codifica para la proteína irrelevante β -galactosidasa. Ninguno de los esplenocitos reaccionó a la librería de péptidos de control derivada de VIH. El número de manchas IFN- γ de los esplenocitos incubados en el medio solo representan la activación basal de las células recién aisladas. Debido a que la activación basal es fuertemente dependiente del individuo, la corrección de fondo se realizó de forma individual por sustracción del número de manchas en cavidades medianas de todos los otros valores.

Los resultados de estos experimentos se muestran en las figuras 27 a 34.

20

LISTADO DE SECUENCIAS

<110> CureVac GmbH

<120> NSCLC - Cocktail

<130> CU01P068W01

<150> PCT/EP2007/008770

<151> 2007-10-09

<160> 28

<170> PatentIn versión 3.3

<210> 1

<211> 1668

<212> ADN

<213> Artificial

<220>

<223> Descripción de secuencia (véase Figura 1): Secuencia ARN
(secuencia de inicio con base en el tipo silvestre) que codifica
para MUC1 (HsMUC1 - 5xVNTR)

<400> 1

atgacaccgg gcaccagtc tcctttcttc ctgctgctgc tcctcacagt gcttacagtt	60
gttacagggt ctggtcatgc aagctctacc ccagggtggag aaaaggagac ttcgggtacc	120
cagagaagtt cagtgccag ctctactgag aagaatgctg tgagtatgac cagcagcgta	180
ctctccagcc acagcccggg ttcaggctcc tccaccactc agggacagga tgctactctg	240
gccccggcca cggaaccagc ttcaggttca gctgccacct ggggacagga tgctacctcg	300
gtcccagtca ccaggccagc cctgggctcc accaccccgc cagcccacga tgctacctca	360
gccccggaca acaagccagc cccgggctcc accgcccccc cagcccacgg tgctacctcg	420
gccccggaca ccaggccggc cccgggctcc accgcccccc cagcccacgg tgctacctcg	480
gccccggaca ccaggccggc cccgggctcc accgcccccc cagcccacgg tgctacctcg	540
gccccggaca ccaggccggc cccgggctcc accgcccccc cagcccacgg tgctacctcg	600
gccccggaca ccaggccggc cccgggctcc accgcccccc cagcccacgg tgctacctcg	660
gccccggaca ccaggccggc cccgggctcc accgcccccc cagcccacgg tgctacctcg	720
gccccggaca acaggcccgc cttgggctcc accgcccctc cagtccacaa tgctacctcg	780
gcctcaggct ctgcatcagg ctgagcttct actctgggtgc acaacggcac ctctgccagg	840
gctaccacaa ccccagccag caagagcact ccattctcaa ttcccagcca cactctgat	900
actcctacca cccttgccag ccatagcacc aagactgatg ccagtagcac tcaccatagc	960

ES 2 668 926 T3

```

tcggtacctc ctctcacctc ctccaatcac agcacttctc cccagttgtc tactgggggc 1020
tctttctttt tctgtctttt tcacatttca aacctccagt ttaattcctc tctggaagat 1080
cccagcaccg actactacca agagctgcag agagacattt ctgaaatggt tttgcagatt 1140
tataaacaag ggggttttct gggcctctcc aatattaagt tcaggccagg atctgtggtg 1200
gtacaattga ctctggcctt ccgagaaggt accatcaatg tccacgacgt ggagacacag 1260
ttcaatcagt ataaaacgga agcagcctct cgatataacc tgacgatctc agacgtcagc 1320
gtgagtgatg tgccatttcc tttctctgcc cagtctgggg ctgggggtgcc aggctggggc 1380
atcgcgctgc tgggtctggt ctgtgttctg gttgcgctgg ccattgtcta tctcattgcc 1440
ttggctgtct gtcagtgccg ccgaaagaac tacgggcagc tggacatctt tccagcccgg 1500
gatacctacc atcctatgag cgagtacccc acctaccaca cccatggggc ctatgtgccc 1560
cctagcagta ccgatcgtag cccctatgag aaggtttctg caggtaacgg tggcagcagc 1620
ctctcttaca caaaccagc agtggcagcc gcttctgcc aactgtag 1668

```

```

<210> 2
<211> 1668
<212> ADN
<213> Artificial

```

```

<220>
<223> Descripción de secuencia (véase Figura 2): secuencia de ARN
estabilizada (GC) que codifica para MUC1 (HsMUC1 GC - 5xVNTR)

```

```

<400> 2
atgacccccg gcaccagag cccgttcttc ctgctcctgc tgctcacggt gctgaccgtc 60
gtgaccgggt cgggccacgc cagctccacc cccggggggc agaaggagac gagcgccacc 120
cagcgggtcca gcgtgccctc cagcaccgag aagaacggcg tctccatgac cagctccgtg 180
ctgagctccc acagccccgg gtccggcagc tccacgaccc agggccagga cgtgaccctc 240
gccccggcca ccgagcccgc cagcgggtcc gccgcgacgt ggggccagga cgtcaccagc 300
gtgcccgtga cccgccccgc cctggggagc accacgccgc ccgcccacga cgtcacctcc 360
gccccgaca acaagcccgc gccgggcagc accgcccccc ccgcccacgg ggtgacctcc 420
gccccgaca cgcggccggc ccccggcagc accgcgcccc ccgcccacgg cgtgacctcc 480
gccccgaca cccgccccgc ccccgggagc acggccccgc cggcgcacgg cgtcacctcc 540
gccccgaca cccgccccgc ccccgggagc accgccccgc ccgcccacgg cgtgacctcc 600
gcgccccgaca cccgccccgc ccccggcagc accgcccccc ccgcccacgg ggtgacctcc 660

```


ES 2 668 926 T3

```

gccccggaca cgcgggcccgc gcccggcagc accgccccgc cggcccacgg ggtcacctcc 720
gcccccgaca accgccccgc gctgggcagc accgcccccc cgggtgcacaa cgtgacgtcc 780
gccagcgggt ccgccagcgg ctccgccagc accctcgtcc acaacggcac cagcgcgcgg 840
gccaccacca cgcccgcctc caagagcacc cccttctcca tccccagcca cactccgac 900
accccgacca cgctggccag cactccacc aagaccgacg ccagctccac ccaccacagc 960
tccgtgccgc cgctgacgag ctccaaccac agcacctccc cccagctcag caccgggggtg 1020
tccttcttct tcctgagctt ccacatcagc aacctgcagt tcaactccag cctcgaggac 1080
ccgtccaccg actactacca ggagctgcag cgcgacatca gcgagatggt cctgcagatc 1140
tacaagcagg gcgggttcct cggcctgtcc aacatcaagt tccggcccgg gagcgtcgtg 1200
gtgcagctga cgctcgcgtt ccgcgagggc accatcaacg tccacgacgt ggagaccag 1260
ttcaaccagt acaagaccga ggccgcctcc cgggtacaacc tgacgatcag cgacgtctcc 1320
gtgagcgacg tgcccttccc cttctccgcc cagagcggcg ccgggggtccc gggctggggg 1380
atcgcgctgc tcgtgctggt gtgcgtcctg gtggccctcg ccatcgtgta cctgatcgcc 1440
ctggcggctc gccagtgccg ccggaagaac tacggccagc tcgacatctt ccccgccgc 1500
gacacctacc accccatgtc cgagtaccg acctaccaca cccacgggcg gtaoctgccc 1560
cccagctcca cggaccgcag ccctacgag aagggtgtccg ccggcaacgg cgggagctcc 1620
ctgagctaca ccaaccggc cgtcgccgcg gccagcgcca acctgtga 1668

```

```

<210> 3
<211> 1263
<212> ADN
<213> Artificial

```

```

<220>
<223> Descripción de secuencia (véase Figura 3): Secuencia ARN
      (secuencia de inicio con base en el tipo silvestre) que codifica
      para 5T4 (Hs5T4 (glicoproteína de trofoblasto TPBG))

```

```

<400> 3
atgcctgggg ggtgctcccg gggccccgcc gccggggacg ggcgtctgcy gctggcgcga 60
ctagcgtgg tactcctggg ctgggtctcc tcgtcttctc ccacctctc ggcactctcc 120
ttctctctc cggcgccggt cctggcttcc gccgtgtccg cccagcccc gctgcccggac 180
cagtgccccg cgctgtgcga gtgctccgag gcagcgcgca cagtcaagtg cgttaaccgc 240
aatctgaccg aggtgcccac ggacctgcc gctacgtgc gcaacctctt ccttaccggc 300
aaccagctgg ccgtgctccc tgccggcgcc ttcgcccgcc ggccgcccgt ggcggagctg 360

```

ES 2 668 926 T3

```

gccgcgctca acctcagcgg cagccgcctg gacgaggtgc gcgcggggcgc cttcgagcat 420
ctgcccagcc tgcgccagct cgacctcagc cacaaccacac tggccgacct cagtcacctc 480
gctttctcgg gcagcaatgc cagcgtctcg gccccagtc cccttgtgga actgatcctg 540
aaccacatcg tgccccctga agatgagcgg cagaaccgga gcttcgaggg catggtggtg 600
gcggccctgc tggcggggccg tgcactgcag gggctccgcc gcttgagct ggccagcaac 660
cacttccttt acctgccgcg ggatgtgctg gcccaactgc ccagcctcag gcacctggac 720
ttaagtaata attcgtggt gagcctgacc tacgtgtcct tccgcaacct gacacatcta 780
gaaagcctcc acctggagga caatgcctc aaggctcttc acaatggcac cctggctgag 840
ttgcaaggtc taccacat tagggttttc ctggacaaca atccctgggt ctgcgactgc 900
cacatggcag acatggtgac ctggctcaag gaaacagagg tagtgcaggg caaagaccgg 960
ctcacctgtg catatccgga aaaaatgagg aatcgggtcc tcttggaact caacagtgtc 1020
gacctggact gtgaccgat tcttccccca tccctgcaaa cctcttatgt cttcctgggt 1080
attgttttag ccctgatagg cgctattttc ctctgggtt tgtatttgaa ccgcaagggg 1140
ataaaaaagt ggatgcataa catcagagat gcctgcaggg atcacatgga agggtatcat 1200
tacagatatg aatcaatgc ggaccccaga ttaacgaacc tcagttctaa ctoggatgtc 1260
tga 1263

```

<210> 4

<211> 1263

<212> ADN

<213> Artificial

<220>

<223> Descripción de secuencia (véase Figura 4): secuencia de ARN estabilizada (GC) que codifica para 5T4 (Hs5T4 GC)

<400> 4

```

atgcccggcg ggtgcagccg gggcccggcc gccggggacg gccgcctgcg gctcgcgcgc 60
ctggccctgg tgctcctggg gtgggtctcc agctccagcc ccacctccag cgctccagc 120
ttctccagct ccgccccctt cctggccagc gcggtgtccg cccagcccc gctccccgac 180
cagtgccccg ccctgtgcga gtgcagcgag gccgcgcgga ccgtgaagtg cgtcaaccgc 240
aacctgacgg aggtgcccac cgacctcccg gcctacgtgc ggaacctggt cctgaccggc 300
aaccagctcg ccgtcctgcc cgccggcgcc ttcgcgcgcc ggccgcccct ggccgagctc 360
gccgcctga acctgtccgg gagccgcctc gacgaggtgc gggccggcgc gttcgagcac 420
ctgccgtccc tgcgccagct cgacctgagc cacaaccccc tggccgacct ctcccccttc 480

```

ES 2 668 926 T3

```

gccttcagcg ggagcaacgc ctccgtgagc gccccctccc cgctggtcga gctgatectc 540
aaccacatcg tgccccccga ggacgagcgg cagaaccgca gcttcgaggg catggtggtc 600
gcggccttgc tggccggggc ggccctccag ggcttgcgcc ggctggagct cgctccaac 660
cacttctgt acctgccccg cgacgtgctc gcgcagctgc cgagcctgcg gcacctcgac 720
ctgtccaaca acagcctggg gtccctcacc tacgtcagct tccgcaacct gacgcacctg 780
gagtccctcc acctggagga caacgccctg aagggtgctgc acaacggcac cctcgccgag 840
ctgcaggggc tgccccacat ccgggtgttc ctgcacaaca acccctgggt ctgcgactgc 900
cacatggccg acatggtgac ctggctgaag gagaccgagg tggccaggg caaggaccgc 960
ctgacgtgcg cgtaccccga gaagatgcgg aaccgggtgc tcctggagct gaacagcgcc 1020
gacctcgact gcgaccgat cctgcccccc tcctgcaga ccagctacgt gttcctcggg 1080
atcgtcctgg cctgatcgg cgccatcttc ctctgggtgc tgtacctcaa ccgcaagggc 1140
atcaagaagt ggatgcacaa catccgggac gcctgcccgc accacatgga ggggtaccac 1200
taccggtacg agatcaacgc ggacccccgc ctgaccaacc tgtccagcaa ctccgacgtc 1260
tga 1263

```

```

<210> 5
<211> 3768
<212> ADN
<213> Artificial

```

```

<220>
<223> Descripción de secuencia (véase Figura 5): Secuencia ARN
(secuencia de inicio con base en el tipo silvestre) que codifica
para Her-2/neu (HsHer2/neu (homólogo oncogénico viral de leucemia
eritroblástico v-erb-b2 2));

```

```

<400> 5
atggagctgg cggccttgtg ccgctggggg ctccctcctcg ccctcttgcc ccccggagcc 60
gcgagcacc aagtgtgcac cggcacagac atgaagctgc ggctccctgc cagtcccagag 120
accacactgg acatgctccg ccacctctac cagggctgcc aggtggtgca gggaaacctg 180
gaactcacct acctgcccac caatgccagc ctgtccttcc tgcaggatat ccaggaggtg 240
cagggctacg tgctcatcgc tcacaaccaa gtgaggcagg tcccactgca gaggctgcgg 300
attgtgcgag gcaccagct ctttgaggac aactatgcc tggccgtgct agacaatgga 360
gaccgctga acaataccac ccctgtcaca ggggcctccc caggaggcct gcgggagctg 420
cagcttcgaa gcctcacaga gatcttgaaa ggaggggtct tgatccagcg gaacccccag 480

```

ES 2 668 926 T3

ctctgctacc	aggacacgat	tttgtggaag	gacatcttcc	acaagaacaa	ccagctggct	540
ctcactga	tagacaccaa	ccgctctcgg	gcctgccacc	cctgttctcc	gatgtgtaag	600
ggctcccgt	gctggggaga	gagttctgag	gattgtcaga	gcctgacgcg	cactgtctgt	660
gccggtggct	gtgcccgtg	caaggggcca	ctgcccactg	actgctgcca	tgagcagtgt	720
gctgccggct	gcacgggccc	caagcactct	gactgcctgg	cctgcctcca	cttcaaccac	780
agtggcatct	gtgagctgca	ctgcccagcc	ctggtcacct	acaacacaga	cacgtttgag	840
tccatgccca	atcccagagg	ccggtataca	ttcggcgcca	gctgtgtgac	tgctgtccc	900
tacaactacc	tttctacgga	cgtgggatcc	tgcaccctcg	tctgccccct	gcacaaccaa	960
gaggtgacag	cagaggatgg	aacacagcgg	tgtgagaagt	gcagcaagcc	ctgtgccoga	1020
gtgtgctatg	gtctgggcat	ggagcacttg	cgagaggatga	gggcagttac	cagtgccaat	1080
atccaggagt	ttgctggctg	caagaagatc	tttgggagcc	tggcatttct	gccggagagc	1140
tttgatgggg	accagcctc	caacactgcc	ccgctccagc	cagagcagct	ccaagtgttt	1200
gagactctgg	aagagatcac	aggttacct	tacatctcag	catggccgga	cagcctgcct	1260
gacctcagcg	tcttccagaa	cctgcaagta	atccggggac	gaattctgca	caatggcgcc	1320
tactcgctga	ccctgcaagg	gctgggcata	agctggctgg	ggctgcgctc	actgagggaa	1380
ctgggcagtg	gactggccct	catccacat	aacaccacc	tctgcttctg	gcacacggtg	1440
ccctgggacc	agctctttcg	gaaccgcac	caagctctgc	tccacactgc	caaccggcca	1500
gaggacgagt	gtgtgggcca	gggcctggcc	tgccaccagc	tgtgcgcccg	agggcactgc	1560
tggggctccag	ggcccacca	gtgtgtcaac	tgagccagt	tccttcgggg	ccaggagtgc	1620
gtggaggaat	gccgagtact	gcaggggctc	cccagggagt	atgtgaatgc	caggcactgt	1680
ttgccgtgcc	accctgagtg	tcagccccag	aatggctcag	tgacctgttt	tggaccggag	1740
gctgaccagt	gtgtggcctg	tgcccactat	aaggaccctc	ccttctgcgt	ggcccgctgc	1800
cccagcggtg	tgaaacctga	cctctcctac	atgccatct	ggaagtctcc	agatgaggag	1860
ggcgcatacc	agccttgccc	catcaactgc	accactcct	gtgtggacct	ggatgacaag	1920
ggctgccccg	ccgagcagag	agccagccct	ctgacgtcca	tcatctctgc	ggtggttggc	1980
attctgctgg	tcgtggtctt	gggggtggtc	tttgggatcc	tcatcaagcg	acggcagcag	2040
aagatccgga	agtacacgat	gcggagactg	ctgcaggaaa	cggagctggt	ggagccgctg	2100
acacctagcg	gagcgatgcc	caaccaggcg	cagatgcgga	tctgaaaga	gacggagctg	2160
aggaaggtga	aggtgcttgg	atctggcgct	tttggcacag	tctacaaggg	catctggatc	2220

ES 2 668 926 T3

cctgatgggg	agaatgtgaa	aattccagtg	gccatcaaag	tgttgaggga	aaacacatcc	2280
cccaaagcca	aaaagaaat	cttagacgaa	gcatacgtga	tggctggtgt	gggctcccca	2340
tatgtctccc	gccttctggg	catctgcctg	acatccacgg	tgcagctggt	gacacagctt	2400
atgccctatg	gctgcctctt	agaccatgtc	cgggaaaacc	gcggacgcct	gggctcccag	2460
gacctgctga	actggtgtat	gcagattgcc	aaggggatga	gctacctgga	ggatgtgcgg	2520
ctcgtacaca	gggacttggc	cgctcggaac	gtgctggtca	agagtcccaa	ccatgtcaaa	2580
attacagact	tcgggctggc	tcggctgctg	gacattgacg	agacagagta	ccatgcagat	2640
gggggcaagg	tgcccatcaa	gtggatggcg	ctggagtcca	ttctccgccg	gcggttcacc	2700
caccagagtg	atgtgtggag	ttatggtgtg	actgtgtggg	agctgatgac	ttttggggcc	2760
aaaccttacg	atgggatccc	agcccgggag	atccctgacc	tgctggaaaa	gggggagcgg	2820
ctgccccagc	cccccatctg	caccattgat	gtctacatga	tcatggtcaa	atggttgatg	2880
attgactctg	aatgtcggcc	aagattccgg	gagttggtgt	ctgaattctc	ccgatggcc	2940
agggaccccc	agcgctttgt	ggtcatccag	aatgaggact	tgggcccagc	cagtcccttg	3000
gacagcacct	tctaccgctc	actgctggag	gacgatgaca	tgggggacct	ggtggatgct	3060
gaggagtatc	tggtagccca	gcagggttc	ttctgtccag	accctgcccc	gggogctggg	3120
ggcatggtcc	accacaggca	ccgcagctca	tctaccagga	gtggcggtgg	ggacctgaca	3180
ctagggtctg	agccctctga	agaggaggcc	cccaggtctc	cactggcacc	ctccgaaggg	3240
gctggctccg	atgtatttga	tggtagacctg	ggaatggggg	cagccaaggg	gctgcaaagc	3300
ctccccacac	atgaccccag	ccctctacag	cggtacagtg	aggaccccac	agtacccttg	3360
ccctctgaga	ctgatggcta	cgttgcccc	ctgacctgca	gccccagcc	tgaatatgtg	3420
aaccagccag	atggtcggcc	ccagccccct	tcgccccgag	agggccctct	gcctgctgcc	3480
cgacctgctg	gtgccactct	ggaaaggccc	aagactctct	ccccagggaa	gaatggggtc	3540
gtcaaagacg	tttttgctt	tgggggtgcc	gtggagaacc	ccgagtactt	gacaccccag	3600
ggaggagctg	cccctcagcc	ccaccctcct	cctgccttca	gcccagcctt	cgacaacctc	3660
tattactggg	accaggacc	accagagcgg	ggggctccac	ccagcacctt	caaagggaca	3720
cctacggcag	agaaccaga	gtacctgggt	ctggacgtgc	cagtgtga		3768
<210>	6					
<211>	3768					
<212>	ADN					
<213>	Artificial					
<220>						

ES 2 668 926 T3

<223> Descripción de secuencia (véase Figura 6): secuencia de ARN estabilizada (GC) que codifica para Her-2/neu (HsHer2/neu GC)

<400> 6

```

atggagctgg cgcacctctg ccgggtggggc ctgctgctcg cgctgctgcc cccggggggcc      60
gccagcacc aggtgtgcac cggcacggac atgaagctcc gcctgcccgc ctcccccgag      120
accacactgg acatgctccg gcacctgtac caggggtgcc aggtcgtgca gggcaacctg      180
gagctcacct acctgcccac caacgccagc ctgtccttcc tccaggacat ccaggagggtg      240
caggggtacg tcctgatcgc gcacaaccag gtgcgccagg tgccgctgca ggggctccgc      300
atcgtccggg gcacgcagct gttcgaggac aactacgcc tggccgtgct cgacaacggc      360
gacccctga acaacaccac ccccgtagcc ggggccagcc ccggcgggct gcgcgagctc      420
cagctgcggt ccctgacgga gatcctcaag ggcgggggtcc tgatccagcg caaccgcag      480
ctgtgctacc aggacacat cctctggaag gacatcttcc acaagaacaa ccagctggcg      540
ctgacctca tcgacaccaa ccggagccgc gcctgccacc cctgctcccc catgtgcaag      600
ggcagccggt gctggggcga gtccagcgag gactgccagt ccctgacgcg caccgtgtgc      660
gccgggggct gcgcccggtg caagggggcc ctgccgaccg actgctgcca cgagcagtgc      720
gccgcgggct gcaccggccc caagcacagc gactgectcg cctgectgca cttcaaccac      780
tccgggatct gcgagctgca ctgccccgcc ctcgtagcgt acaacaccga caccttcgag      840
agcatgcca acccggaggg ccgctacacc ttcggggcct cctgcgtcac ggctgcccc      900
tacaactacc tgagcaccga cgtgggctcc tgcaccctgg tgtgccccct ccacaaccag      960
gaggtcaccg cggaggacgg gacgcagcgg tgcgagaagt gcagcaagcc ctgcgcccgc     1020
gtgtgctacg gcctgggcat ggagcacctg cgggagggtg gcgcgctcac ctccgccaac     1080
atccaggagt tcgccgggtg caagaagatc ttcggcagcc tcgcttctct gccggagagc     1140
ttcgacgggg accccgcctc caacaccgcc ccctgcagc ccgagcagct gcaggtgttc     1200
gagacctcg aggatcac gggctacctg tacatcagcg cctggccgga ctccctgccc     1260
gacctcagcg tgttccagaa cctgcaggtc atccgggggc gcatcctgca caacggcgcc     1320
tactccctca ccctgcaggg cctggggatc agctggctcg gcctgcggtc cctgcgggag     1380
ctcgggagcg gcctggcgct gatccaccac aacaccacc tctgcttctg gcacaccgtg     1440
ccctgggacc agctgttccg caacccccac caggccctgc tccacacggc caaccggccg     1500
gaggacgagt gcgtcgggga gggcctggcc tgccaccagc tgtgcgcgcg cggccactgc     1560
tgggggcccc gccccacca gtgcgtgaac tgctcccagt tcctccgggg gcaggagtgc     1620

```

ES 2 668 926 T3

gtcgaggagt	gccgcgtgct	gcagggcctg	ccgcgggagt	acgtgaacgc	ccgccactgc	1680
ctccccctgcc	accccgagtg	ccagccccag	aacggcagcg	tcacctgctt	cgggcccggag	1740
gccgaccagt	gcgtaggctg	cgcccactac	aaggaccgcg	ccttctgcgt	ggcgcgggtgc	1800
ccctccggcg	tcaagccgga	cctgagctac	atgccatct	ggaagttccc	cgacgaggag	1860
ggggcctgcc	agccctgccc	gatcaactgc	accactcct	gcgtggacct	ggacgacaag	1920
ggctgccccg	ccgagcagcg	cgccagcccc	ctcacgtcca	tcatcagcgc	cgtggtcggg	1980
atcctgctgg	tggtagctct	ggcgtgggtg	ttcggcatcc	tgatcaagcg	gcccagcag	2040
aagatccgga	agtacacat	gcgccggctg	ctccaggaga	ccgagctggt	cgagcccctg	2100
accccgctccg	gggcgatgcc	caaccaggcc	cagatgcgca	tcctcaagga	gaccgagctg	2160
cggaaggtga	aggtgctggg	cagcggggcc	ttcggcacgg	tctacaaggg	gatctggatc	2220
cccgacggcg	agaacgtgaa	gatccccgtg	gccatcaagg	tcctccgcga	gaacacctcc	2280
ccgaaggcca	acaaggagat	cctggacgag	gcgtacgtga	tggccggcgt	ggggagcccc	2340
tacgtcagcc	ggctgctcgg	catctgcctg	acctccaccg	tgacgtggt	gacgcagctc	2400
atgccctacg	ggtgcctgct	ggaccacgtc	cgcgagaacc	ggggccggct	cgggagccag	2460
gacctgctga	actggtgcat	gcagatcgcc	aagggcatgt	cctacctcga	ggacgtgcgc	2520
ctggtgcacc	gggacctggc	cgcgcgcaac	gtcctcgtga	agagccccaa	ccacgtgaag	2580
atcaccgact	tcggcctggc	ccggctgctc	gacatcgacg	agaccgagta	ccacgccgac	2640
gggggcaagg	tcccgatcaa	gtggatggcc	ctggagtcca	tcctgcgccg	gcgcttcacc	2700
caccagagcg	acgtgtggtc	ctacgggggtg	acggtctggg	agctcatgac	cttcggcgcc	2760
aagccctacg	acgggatccc	cgcgcgggag	atccccgacc	tgctggagaa	gggcgagcgc	2820
ctcccccagc	cccccatctg	caccatcgac	gtgtacatga	tcatggtgaa	gtgctggatg	2880
atcgacagcg	agtgccggcc	gcgcttcggg	gagctggtct	ccgagttcag	ccgcatggcc	2940
cgggaccccc	agcgcttcgt	ggtgatccag	aacgaggacc	tgggccccgc	ctccccctc	3000
gacagcacct	tctaccggtc	cctgctggag	gacgacgaca	tgggggacct	cgtcagcgc	3060
gaggagtacc	tggtagcgca	gcagggcttc	ttctgccccg	accccgcccc	cggggcgggc	3120
ggcatggtgc	accaccgcca	ccggagctcc	agcacgcgct	ccgggggcgg	ggacctgacc	3180
ctcggcctgg	agccgagcga	ggaggaggcc	ccgcggagcc	ccctggcccc	ctccgagggg	3240
gccggcagcg	acgtcttcga	cgcgacctc	gggatggggc	ccgcgaaggg	gctgcagtcc	3300
ctgccgacc	acgaccccag	ccccctccag	cgctactccg	aggaccccac	cgtgccgctg	3360

ES 2 668 926 T3

```

cccagcgaga cggacggcta cgtggccccc ctgacctgct ccccgcagcc ggagtagctc 3420
aaccagcccc acgtgcggcc ccagcccccg agcccccgagg agggggccct cccggccgcc 3480
cgccccgcgg gcgccaccct ggagcggccc aagaccctgt cccccggcaa gaacgggggtg 3540
gtcaaggacg tgttcgcctt cggcggggcc gtcgagaacc cggagtagct cacgccccag 3600
ggcgggggcc cgccccagcc ccacccgcc cccgccttca gccccgcctt cgacaacctg 3660
tactactggg accaggacc gccggagcgc ggcgcccccc cctccacctt caagggcacc 3720
ccgaccgccg agaaccccga gtacctgggg ctgcagctgc ccgtgtga 3768

```

<210> 7

<211> 3399

<212> ADN

<213> Artificial

<220>

<223> Descripción de secuencia (véase Figura 7): Secuencia ARN
(secuencia de inicio con base en el tipo silvestre) que codifica
para hTERT (HsTERT (transcriptasa inversa telomerasa))

<400> 7

```

atgccgcgcg ctccccgctg ccgagccgtg cgctccctgc tgcgcagcca ctaccgcgag 60
gtgctgccgc tggccacgtt cgtgcggcgc ctggggcccc agggctggcg gctggtgcag 120
cgcggggacc cggcggcttt ccgcgcgctg gtggcccagt gcctggtgtg cgtgccctgg 180
gacgcacggc cgccccccgc cgccccctcc ttccgccagg tgtcctgcct gaaggagctg 240
gtggcccagag tgctgcagag gctgtgcgag cgcggcgcga agaactgtgt ggccttcggc 300
ttcgcgctgc tggacggggc ccgcgggggc cccccgagg ccttcaccac cagcgtgcgc 360
agctacctgc ccaacacggt gaccgacgca ctgcggggga gcggggcgctg ggggctgctg 420
ctgcgccgcg tgggcgacga cgtgctggtt cacctgctgg cacgctgcgc gctctttgtg 480
ctggtggctc ccagctgcgc ctaccaggtg tgcgggccgc cgctgtacca gctcggcgct 540
gccactcagg cccggcccc ccacacgct agtggacccc gaaggcgtct gggatgcgaa 600
cgggcctgga accatagcgt cagggaggcc ggggtcccc tgggcctgcc agccccgggt 660
gcgaggaggc gcgggggagc tgccagccga agtctgccgt tgcccaagag gccaggcgt 720
ggcgtgccc ctgagccgga gcggacgccc gttgggcagg ggtcctgggc ccacccgggc 780
aggacgcgtg gaccgagtga ccgtggtttc tgtgtggtgt cacctgccag acccgccgaa 840
gaagccacct ctttgagggg tgcgctctct ggcacgcgcc actcccaccc atcgtggggc 900
cgccagcacc acgcgggccc cccatccaca tcgcgggccac cacgtccctg ggacacgcct 960

```


ES 2 668 926 T3

tgtccccg	tgtacgccga	gaccaagcac	ttcctctact	cctcaggcga	caaggagcag	1020
ctgcggccct	ccttctact	cagctctctg	aggcccagcc	tgactggcgc	toggaggctc	1080
gtggagacca	tctttctggg	ttccaggccc	tggatgccag	ggactccccg	caggttgccc	1140
cgctgcccc	agcgctactg	gcaaatgcgg	cccctgtttc	tggagctgct	tgggaaccac	1200
gcgcagtgcc	cctacggggt	gctcctcaag	acgcactgcc	cgctgcgagc	tgcggtcacc	1260
ccagcagccg	gtgtctgtgc	ccgggagaag	ccccagggct	ctgtggcggc	ccccgaggag	1320
gaggacacag	acccccgtcg	cctggtgcag	ctgctccgcc	agcacagcag	cccctggcag	1380
gtgtacggct	tcgtgcgggc	ctgcctgcgc	cggctggtgc	ccccaggcct	ctggggctcc	1440
aggcacaacg	aacgccgctt	cctcaggaac	accaagaagt	tcatctccct	ggggaagcat	1500
gccaaactct	cgctgcagga	gctgacgtgg	aagatgagcg	tgcgggactg	cgcttggtcg	1560
cgcaggagcc	caggggttgg	ctgtgttccg	gccgcagagc	accgtctgcg	tgaggagatc	1620
ctggccaagt	tcctgcactg	gctgatgagt	gtgtacgtcg	tcgagctgct	caggtctttc	1680
ttttatgtca	cggagaccac	gtttcaaaag	aacaggctct	ttttctaccg	gaagagtgtc	1740
tggagcaagt	tgcaaagcat	tggaatcaga	cagcacttga	agagggtgca	gctgcgggag	1800
ctgtcggaag	cagaggtcag	gcagcatcgg	gaagccaggc	ccgccctgct	gacgtccaga	1860
ctccgcttca	tccccagcc	tgacgggctg	cggccgattg	tgaacatgga	ctacgtcgtg	1920
ggagccagaa	cgttccgcag	agaaaagagg	gccgagcgtc	tcacctcgag	ggtgaaggca	1980
ctgttcagcg	tgctcaacta	cgagcgggcg	cggcgccccg	gcctcctggg	cgctctgtg	2040
ctgggcctgg	acgatatcca	cagggcctgg	cgcaccttcg	tgctgcgtgt	gcgggcccag	2100
gaccgcgcgc	ctgagctgta	ctttgtcaag	gtggatgtga	cgggcgcgta	cgacaccatc	2160
ccccaggaca	ggctcacgga	ggtcatcgcc	agcatcatca	aaccccagaa	cacgtactgc	2220
gtgcgtcgg	atgccgtggt	ccagaaggcc	gcccattggc	acgtccgcaa	ggccttcaag	2280
agccacgtct	ctaccttgac	agacctccag	ccgtacatgc	gacagtctgt	ggctcacctg	2340
caggagacca	gcccgtgag	ggatgccgtc	gtcatcgagc	agagctcctc	cctgaatgag	2400
gccagcagt	gcctcttcga	cgtcttccta	cgcttcatgt	gccaccacgc	cgtgcgcac	2460
aggggcaagt	cctacgtcca	gtgccagggg	atcccgcagg	gctccatcct	ctccacgctg	2520
ctctgcagcc	tgtgctacgg	cgacatggag	aacaagctgt	ttgcggggat	tggcggggac	2580
gggtgctcc	tgcgtttgg	ggatgatttc	ttgttgggtga	cacctcacct	caccacgcg	2640
aaaaccttc	tcaggaccct	ggtccgaggt	gtccctgagt	atggctgcgt	ggtgaacttg	2700

ES 2 668 926 T3

```

cggaagacag tggatgaactt ccctgtagaa gacgaggccc tgggtggcac ggcttttggt 2760
cagatgccgg cccacggcct attcccctgg tgcggcctgc tgctggatac cgggacctg 2820
gaggtgcaga gcgactactc cagctatgcc cggacctcca tcagagccag tctcaccttc 2880
aaccgcggt tcaaggctgg gaggaacatg cgtcgcaaac tctttgggggt cttgctggctg 2940
aagtgtcaca gcctgtttct ggatttgag gtgaacagcc tccagacggg gtgcaccaac 3000
atctacaaga tcctcctgct gcaggcgtac aggtttcacg catgtgtgct gcagctccca 3060
tttcatcagc aagtttgaa gaaccccaca tttttcctgc gcgtcatctc tgacacggcc 3120
tcctctgct actccatcct gaaagccaag aacgcagggg tgtcgtggg ggccaagggc 3180
gccgccggcc ctctgcctc cgaggccgtg cagtggctgt gccaccaagc attcctgctc 3240
aagctgactc gacaccgtgt cacctacgtg cactcctgg ggtcactcag gacagcccag 3300
acgcagctga gtcggaagct cccggggacg acgtgactg cctggaggc cgcagccaac 3360
ccggcactgc cctcagactt caagaccatc ctggactga 3399

```

```

<210> 8
<211> 3399
<212> ADN
<213> Artificial

```

```

<220>
<223> Descripción de secuencia (véase Figura 8): secuencia de ARN
estabilizada (GC) que codifica para hTERT (HsTERT GC)

```

```

<400> 8
atgccccggg ccccgcgctg ccgggcccgtg cgcagcctgc tccgggccca ctaccgagag 60
gtcctgcccc tggcgacctt cgtgcggggc ctcgcccc aggggtggcg gctgggtgag 120
cgcgggcacc ccgcccctt ccgggcccctg gtcgcccagt gcctcgtgtg cgtgccgtgg 180
gacgcgcgcc ccccgcccgc cgccccgagc ttccggcagg tctcctgcct gaaggagctg 240
gtggcccgcg tgctccagcg gctgtgagag cgcggggcga agaacgtcct ggccctcggc 300
ttcgccctcc tggacggggc ccggggcggc cccccgagg ccttcaccac gagcgtgcgc 360
tcctacctgc ccaacaccgt gaccgacgag ctccggggga gcggcgccctg ggggctgctg 420
ctccgccggg tcggcgacga cgtgctggtg cacctgctcg cccgctgcgc cctgttcgtc 480
ctgggtggcc cgtcctgcgc gtaccaggtg tgccggcccc cgctctacca gctgggcgcc 540
gccaccagg cccggcccc gccccagcc agcggcccc ggcgcgggt ggggtgcgag 600
cgcgctgga accactcgt ccgggaggcc ggcgtgcccc tcgggctgcc ggccccggc 660
gcccgccggc gcggcgggag gcctcccgg agcctgcccc tccccagcg cccgcggcgc 720

```

ES 2 668 926 T3

ggcgcggccc ccgagcccga gcggacgccc gtggggcagg gctcctgggc ccacccgggg	780
cgcacccggg gccccagcga ccgcggcttc tgcgtcgtgt cccccgcccg gccggcggag	840
gaggccacca gcctggaggg ggccctgtcc ggcacccgcc acagccaccc ctccgtgggg	900
cggcagcacc acgccggccc ccccagcacg agccgcccgc cccggccctg ggacaccccc	960
tgcccgcccg tctacgccga gaccaagcac ttcctctact ccagcgggga caaggagcag	1020
ctgcggccct cttcctgct cagctccctg cgccccagcc tgaccggcgc gcggcgcctc	1080
gtggagacga tcttctggg ctcccggccg tggatgcccg ggaccccgcg ccggctgccc	1140
cgcctcccgc agcggctactg gcagatgcgc cccctgttcc tggagctcct gggcaaccac	1200
gcccagtgcc cctacggggg cctgctgaag acccactgcc ccctccgggc cgcctgacc	1260
ccggccgcgg gcgtgtgcgc ccgcgagaag ccccagggga gcgtcgcgcg ccccagggag	1320
gaggacacgg acccccggcg cctggtgcag ctgctccggc agcaactccag cccgtggcag	1380
gtgtacggct tcgtccgcgc ctgcctgcgg cgcttgggct cccccggcct ctgggggtcc	1440
cggcacaacg agcgcgggtt cctgcgcaac accaagaagt tcatcagcct gggcaagcac	1500
gcgaagctct ccctgcagga gctgacctgg aagatgagcg tgcgggactg cgcctggctc	1560
cggcgtccc cgggggtcgg ctgcgtgccc gccgcgcgag accggctgcg cgaggagatc	1620
ctggcgaagt tcctccactg gctgatgagc gtgtacgtcg tggagctgct ccggtccttc	1680
ttctacgtga ccgagacgac cttccagaag aaccgcctgt tcttctaccg gaagagcgtc	1740
tggccaagc tgcaagcat cggcatccgc cagcacctca agcgggtgca gctgcgcgag	1800
ctgagcggg ccgaggtgcg gcagcaccgc gaggcccggc ccgccctcct gacctcccgc	1860
ctgcggttca tccccagcc ggacgggctc cgccccatcg tcaacatgga ctacgtggtg	1920
ggcgcggga cttccgccc ggagaagcgc gcggagcggc tgacgagccg ggtcaaggcc	1980
ctgttctccg tgctcaacta cgagcgcgcc cggcgccccg ggctgctggg cgcagcgtg	2040
ctcgggctgg acgacatcca ccgggcctgg cgcaccttcg tcctgcgggt gcgcgcgcag	2100
gacccccgc ccgagctcta cttcgtgaag gtcgacgtga ccggcgccta cgacaccatc	2160
ccccaggacc ggctgacgga ggtgatcgc tccatcatca agccccagaa cacctactgc	2220
gtccgcccgt acgccgtggt gcagaaggcc gcgcacggcc acgtccgcaa ggccttcaag	2280
agccacgtgt ccaccctgac cgacctccag ccgtacatgc ggcagttcgt ggcccacctg	2340
caggagacga gccccctgcg cgacgccgtc gtgatcgagc agtccagctc cctcaacgag	2400
gcgagctccg ggctgttcga cgtgttctc cggttcatgt gccaccacgc cgtccgcctc	2460

ES 2 668 926 T3

```

cggggcaaga gctacgtgca gtgccagggg atccccaggg gctccatcct cagcacccctg 2520
ctgtgctccc tctgctacgg ggacatggag aacaagctgt tcgccggcat ccgccgggac 2580
ggcctgctcc tgcgctgggt ggacgacttc ctctgggtca ccccgcacct gacccacgcc 2640
aagacgttcc tccggaccct ggtgcgcggg gtgccggagt acggctgcgt cgtgaacctg 2700
cggaagaccg tggtaactt ccccgaggag gacgaggccc tcggggggcac cgcgttcgtg 2760
cagatgcccc cccacgggct gttcccctgg tgcggcctgc tctggacac ccggacgctg 2820
gaggtccaga gcgactacag ctctacgcc cgcaccagca tccgggcctc cctcaccttc 2880
aaccgcggt tcaaggccgg gcggaacatg cgccggaagc tgttcggcgt gctgcgctc 2940
aagtgccaca gcctgttcct ggacctccag gtcaactccc tgcagaccgt gtgcacgaac 3000
atctacaaga tctgctcct gcaggcgtac cggttccacg cctgctgctg gcagctcccg 3060
ttccaccagc aggtctggaa gaaccccacc ttcttctgc gcgtgatcag cgacaccgcc 3120
tcctgtgct acagatcct caaggccaag aacgccggga tgtccctggg cggaagggg 3180
gccgccggcc ccctgccag cgaggccgtg cagtggctct gccaccagge ctctctgctg 3240
aagctcacc ggaccgcgt cacgtacgtg ccgctgctgg gctccctccg gaccgcgcag 3300
accagctga gccgcaagct gcccgggacc acgctcaccg cctggaggc cgccgcgaac 3360
cccgcctgc cctccgactt caagaccatc ctcgactga 3399

```

```

<210> 9
<211> 1554
<212> ADN
<213> Artificial

```

```

<220>
<223> Descripción de secuencia (véase Figura 9): Secuencia ARN
      (secuencia de inicio con base en el tipo silvestre) que codifica
      para WT1 (HsWT1 (tumor Wilms 1));

```

```

<400> 9
ctgcaggacc cggcttccac gtgtgtcccg gagccggcgt ctacagcacac gctccgctcc 60
gggctgggt gcctacagca gccagagcag cagggagtcc gggaccggg cggcatctgg 120
gccaagttag gcgccgccga ggccagcgt gaacgtctcc agggccggag gagccgcggg 180
gcgtccgggt ctgagccgca gcaaatgggc tccgacgtgc gggacctgaa cgcgctgctg 240
cccgcctcc cctccctggg tggcggcggc ggctgtgccc tgctgtgag cggcgcggcg 300
cagtgggcgc cgggtgctgga ctttgcgccc ccgggcgctt cggcttacgg gtcggtgggc 360
ggccccgcgc cgccaccggc tccgccgcca cccccgccgc cgccgcctca ctcttcatc 420

```

ES 2 668 926 T3

```

aacaggagc cgagctgggg cggcgcggag ccgcacgagg agcagtgcct gagcgccttc 480
actgtccact tttccggcca gttcactggc acagccggag cctgtcgcta cgggccccttc 540
ggtcctcctc cgcccagcca ggcgtcatcc ggccaggcca ggatgtttcc taacgcgccc 600
tacctgcca gctgcctcga gagccagccc gctattcgca atcagggtta cagcacggtc 660
accttcgacg ggacgcccag ctacggtcac acgccctcgc accatgcggc gcagttcccc 720
aaccactcat tcaagcatga ggatcccatg ggccagcagg gctcgtctggg tgagcagcag 780
tactcgggtc cgccccgggt ctatgggtgc cacaccccca ccgacagctg caccggcagc 840
caggctttgc tgctgaggac gccctacagc agtgacaatt tataccaaat gacatcccag 900
cttgaatgca tgacctgaa tcagatgaac ttaggagcca ccttaaaggg agttgctgct 960
gggagctcca gctcagtgaa atggacagaa gggcagagca accacagcac agggtacgag 1020
agcgataacc acacaacgcc catcctctgc ggagcccaat acagaataca cacgcacggc 1080
gtcttcagag gcattcagga tgtgcgacgt gtgcctggag tagccccgac tcttgtacgg 1140
tcggcatctg agaccagtga gaaacgcccc ttcattgtgtg cttaccagg ctgcaataag 1200
agatatttta agctgtccca cttacagatg cacagcagga agcacactgg tgagaaacca 1260
taccagtgtg acttcaagga ctgtgaacga aggttttctc gttcagacca gctcaaaaga 1320
cacciaagga gacatacagg tgtgaaacca ttccagtgtg aaacttgtca gcgaaagttc 1380
tcccgggccg accacctgaa gaccacacc aggactcata caggtaaac aagtgaaaag 1440
cccttcagct gtcggtgcc aagttgtcag aaaaagtttg cccggtcaga tgaattagtc 1500
cgccatcaca acatgcatca gagaaacatg accaaactcc agctggcgct ttga 1554

```

```

<210> 10
<211> 1554
<212> ADN
<213> Artificial

```

```

<220>
<223> Descripción de secuencia (véase Figura 10): Secuencia ARN que
codifica para WT1 (HsWT1 (tumor Wilms 1)) que muestran una
secuencia con contenido GC reducido en región 325-408 de la
secuencia en comparación con la región correspondiente de la
secuencia tipo silvestre

```

```

<400> 10
atgcaggacc ccgcccagcac ctgcgtgccg gagcccgcct cccagcacac cctccggagc 60
ggccccgggt gcctgcagca gcccgagcag cagggcgtcc gcgacccggg cgggatctgg 120
gcgaagctgg gggccgccga ggctccgcc gagcggctcc agggccgccg gagccgcggc 180

```

ES 2 668 926 T3

```

gcgtccggga gcgagcccca gcagatgggc tccgacgtgc gggacctgaa cgccctgctc 240
cccgcctgctc ccagcctggg cggcgggggc ggggtgcgcc tgccggtctc cggggcggcc 300
cagtgggccc ccgtgctcga cttcgctcct ccaggagcta gcgcttacgg atctctggga 360
ggacctgctc ctccaccgc tccgccacct cctccaccac ctccacctca cagcttcac 420
aagcaggagc cctcctgggg cggcgccgag ccccacgagg agcagtgcct gagcgccttc 480
acggtgact tctccgggca gttcaccggg accgcggggg cctgcccgta cggccccttc 540
ggcccgcgcc ccccgagcca ggctccagc gggcaggccc ggatgttccc caacgcccc 600
tacctcccct cctgcctgga gagccagccg gcgatccgca accagggcta cagcaccgtc 660
acgttcgacg ggaccccctc ctacggccac acccccagcc accacgcgc ccagttcccc 720
aaccactcct tcaagcacga ggaccgatg gggcagcagg gcagcctggg cgagcagcag 780
tactccgtgc ccccgccgt gtacgggtgc cacacccga cggacagctg caccggctcc 840
caggccctcc tgctgaggac ccctacagc tccgacaacc tctaccagat gaccagccag 900
ctggagtgca tgacgtgaa ccagatgaac ctgggggcca ccctcaaggg cgtcgcggcc 960
gggtccagct ccagcgtgaa gtggaccgag ggccagtcca accacagcac cggctacgag 1020
tccgacaacc acacgacccc catcctgtgc ggggccagc accgcatcca caccacggc 1080
gtgttccggg ggatccagga cgtccgccgg gtgcccggcg tggccccgac cctggctccg 1140
agcgcgtccg agacgagcga gaagcggccc ttcatgtgcg cctaccccgg ctgcaacaag 1200
cgctacttca agctcagcca cctgcagatg cactcccgga agcacaccgg ggagaagccc 1260
taccagtgcg acttcaagga ctgagagcgc cggttcagcc gctccgacca gctgaagcgg 1320
caccagcggc gccacaccgg cgtgaagccg ttccagtgca agacctgcca gcggaagttc 1380
agccgctccg accacctcaa gacgcacacc cggaccaca ccgggaagac gagcgagaag 1440
cccttctcct gccgctggcc cagctgccag aagaagtctg cccggctccga cgagctggtg 1500
cgccaccaca acatgcacca gcggaacatg accaagctgc agctcgcct gtga 1554

```

<210> 11

<211> 1554

<212> ADN

<213> Artificial

<220>

<223> Descripción de secuencia (véase Figura 11): secuencia de ARN estabilizada (GC) que codifica para WT1 (HsWT1 GC)

<400> 11

ES 2 668 926 T3

```

atgcaggacc cgcagcac ctgcgtgccg gagcccgcct cccagcacac cctccggagc      60
ggccccgggt gcctgcagca gcccgagcag cagggcgctcc gcgaccgggg cgggatctgg      120
gcgaagctgg gggccgccga ggcctccgcc gagcggctcc agggccggcc gagccggcgc      180
gcgtccggga gcgagcccca gcagatgggc tccgacgtgc gggacctgaa cgccctgctc      240
cccgccgtgc ccagcctggg cggcgggggc ggggtgcgcc tgccgggtctc cggggcgggc      300
cagtgggccc ccgtgctcga cttcgcccc cccggcgcca gcgcgtacgg gtccctgggc      360
ggccccggcc cgccccccgc cccgcccccc cggccgcccc ccccgccgca cagcttcac      420
aagcaggagc cctcctgggg cggcggccgag ccccacgagg agcagtgctt gagcgccttc      480
acggtgact tctccgggca gttcaccggg acccgggggg cctgcccgcta cggccccttc      540
ggcccccccc ccccgagcca ggcctccagc gggcaggccc ggatgttccc caacgcccc      600
tacctccct cctgcctgga gagccagccg gcgatccgca accagggcta cagcaccgtc      660
acgttcgacg ggacccccct ctacggccac acccccagcc accacggcc cagttcccc      720
aaccactcct tcaagcacga ggaccgatg gggcagcagg gcagcctggg cgagcagcag      780
tactccgtgc ccccgcccgt gtacgggtgc cacaccccga cggacagctg caccggctcc      840
caggccctcc tgctgcggac ccctacagc tccgacaacc tctaccagat gaccagccag      900
ctggagtgca tgacgtgga ccagatgaac ctgggggcca ccctcaaggg cgtcggggcc      960
gggtccagct ccagcgtgaa gtggaccgag ggccagtcca accacagcac cggctacgag      1020
tccgacaacc acacgacccc catcctgtgc ggggcccagt accgcatcca caccacggc      1080
gtgttccggg ggatccagga cgtccgccc gtgcccggcg tggccccgac cctgggtccgc      1140
agcgcgtccg agacgagcga gaagcggccc ttcatgtgcg cctacccggg ctgcaacaag      1200
cgctacttca agctcagcca cctgcagatg cactcccgga agcacaccgg ggagaagccc      1260
taccagtgcg acttcaagga ctgcgagcgc cggttcagcc gctccgacca gctgaagcgg      1320
caccagcggc gccacaccgg cgtgaagccg ttccagtgca agacctgcca gcggaagttc      1380
agccgctccg accacctcaa gacgcacacc cggaccaca ccgggaagac gagcgagaag      1440
cccttctcct gccgctggcc cagctgccag aagaagtctg cccggtccga cgagctggtg      1500
cgccaccaca acatgcacca gcggaacatg accaagctgc agctcgcctt gtga          1554

```

```

<210> 12
<211> 2109
<212> ADN
<213> Artificial

```

```

<220>

```

ES 2 668 926 T3

<223> Descripción de secuencia (véase Figura 12): Secuencia ARN
(secuencia de inicio con base en el tipo silvestre) que codifica
para CEA (CEA (antígeno carcinoembriónico) HsCEACAM5);

<400> 12

```

atggagtctc cctcggcccc tccccacaga tgggtgcatcc cctggcagag gctcctgctc      60
acagcctcac ttctaacctt ctggaacctg cccaccactg ccaagctcac tattgaatcc      120
acgccgttca atgtcgcaga ggggaaggag gtgcttctac ttgtccacaa tctgccccag      180
catctttttg gctacagctg gtacaaaggt gaaagagtgg atggcaaccg tcaaattata      240
ggatatgtaa taggaactca acaagctacc ccagggcccc catacagtgg tcgagagata      300
atatacccca atgcatccct gctgatccag aacatcatcc agaatgacac aggattctac      360
accctacagc tcataaagtc agatcttgtg aatgaagaag caactggcca gttccgggta      420
taccgggagc tgccaagcc ctccatctcc agcaacaact ccaaaccgtg ggaggacaag      480
gatgctgtgg ccttcacctg tgaacctgag actcaggacg caacctacct gtggtgggta      540
aacaatcaga gcctcccggg cagtcccagg ctgcagctgt ccaatggcaa caggaccctc      600
actctattca atgtcacaag aatgacaca gcaagctaca aatgtgaaac ccagaaccca      660
gtgagtgcc a ggcgcagtga ttcagtcatc ctgaatgtcc tctatggccc ggatgcccc      720
accatttccc ctctaaacac atcttacaga tcaggggaaa atctgaacct ctctgccac      780
gcagcctcta acccacctgc acagtactct tggtttgtca atgggacttt ccagcaatcc      840
accaagagc tctttatccc caacatcact gtgaataata gtggatccta tacgtgccaa      900
gcccataact cagacactgg cctcaatagg accacagtca cgacgatcac agtctatgca      960
gagccacca aacccttcat caccagcaac aactccaacc ccgtggagga tgaggatgct     1020
gtagccttaa cctgtgaacc tgagattcag aacacaacct acctgtggtg ggtaaataat     1080
cagagcctcc cggtcagtcc caggctgcag ctgtccaatg acaacaggac cctcactcta     1140
ctcagtgtca caaggaatga tgtaggacct tatgagtgtg gaatccagaa caaattaagt     1200
gttgaccaca gcgaccagc catcctgaat gtcctctatg gccagacga ccccaccatt     1260
tccccctcat acacctatta ccgtccaggg gtgaacctca gcctctcctg ccatgcagcc     1320
tctaaccac ctgcacagta ttcttggtg attgatggga acatccagca acacacacaa     1380
gagctcttta tctccaacat cactgagaag aacagcggac tctatactg ccaggccaat     1440
aactcagcca gtggccacag caggactaca gtcaagacaa tcacagtctc tgccggagctg     1500
cccaagccct ccatctccag caacaactcc aaaccctggg aggacaagga tgctgtggcc     1560
ttcacctgtg aacctgaggc tcagaacaca acctacctgt ggtgggtaaa tggtcagagc     1620

```


ES 2 668 926 T3

```

ctcccagtc  gtcccaggct  gcagctgtcc  aatggcaaca  ggaccctcac  tctattcaat  1680
gtcacaagaa  atgacgcaag  agcctatgta  tgtggaatcc  agaactcagt  gagtgcaaac  1740
cgcagtgacc  cagtcaccct  ggatgtcctc  tatggggccg  acacccccat  catttcccc  1800
ccagactcgt  cttacctttc  gggagcgaac  ctcaacctct  cctgccactc  ggccctctaac  1860
ccatccccgc  agtattcttg  gcgtatcaat  gggataccgc  agcaacacac  acaagttctc  1920
tttatcgcca  aatcacgcc  aaataataac  gggacctatg  cctgttttgt  ctctaacttg  1980
gctactggcc  gcaataattc  catagtcaag  agcatcacag  tctctgcac  tgggaacttct  2040
cctggctctc  cagctggggc  cactgtcggc  atcatgattg  gagtgctggt  tggggttgct  2100
ctgatatag  2109

```

```

<210> 13
<211> 2109
<212> ADN
<213> Artificial

```

```

<220>
<223> Descripción de secuencia (véase Figura 13): secuencia de ARN
estabilizada (GC) que codifica para CEA (CEACAM5 GC)

```

```

<400> 13
atggagagcc  cgtcggcccc  gccgcaccgg  tgggtgatcc  cctggcagcg  cctgctcctg  60
accgcgagcc  tgctgacggt  ctggaaccgg  ccgaccaccg  ccaagctgac  catcgagagc  120
acccggttca  acgtggccga  gggcaaggag  gtcctgctcc  tgggtgcacaa  cctgccccag  180
cacctgttcg  ggtacagctg  gtacaagggc  gagcgggtgg  acggcaaccg  gcagatcatc  240
ggctacgtga  tcggcaccca  gcaggccacg  cggggcccgg  cctacagcgg  gcgggagatc  300
atctaccgga  acgccagcct  gctgatccag  aacatcatcc  agaacgacac  cggcttctac  360
accctccacg  tgatcaagtc  ggacctggtg  aacgaggagg  cgaccggcca  gttccggggtc  420
taccgggagc  tgccgaagcc  cagcatcagc  agcaacaaca  gcaagccggt  ggaggacaag  480
gacgccgtgg  cttcacctg  cgagccggag  acccaggacg  ccacgtacct  gtggtgggtg  540
aacaaccaga  gcctgccggt  gtcgcccggg  ctgcagctca  gcaacggcaa  ccgcaccctg  600
accctgttca  acgtgaccgg  gaacgacacc  gccagctaca  agtgcgagac  ccagaaccgg  660
gtcagcgccc  ggcggagcga  cagcgtgatc  ctgaacgtgc  tgtacggccc  cgacgcgccc  720
acgatctcgc  cgctgaacac  cagctaccgg  agcggcgaga  acctcaacct  gagctgccac  780
gccgccagca  accgcggggc  ccagtacagc  tggttcgtga  acgggacctt  ccagcagtcg  840

```

ES 2 668 926 T3

```

accaggagc tgttcatccc gaacatcacc gtgaacaaca gcggcagcta cacctgccag      900
gccacaaca gcgacacggg cctgaaccgg accaccgtga ccaccatcac cgtctacgcc      960
gagccccga agccgttcat cagcagcaac aacagcaacc cgggtggagga cgaggacgcg    1020
gtggcctga cctgcgagcc ggagatccag aacaccacct acctgtggtg ggtgaacaac    1080
cagtcgctcc cggtgagccc ccgcctgcag ctgagcaacg acaaccggac cctgaccctg    1140
ctgagcgtga cgcggaacga cgtcggcccc tacgagtgcg gcatccagaa cgagctcagc    1200
gtggaccaca gcgacccggg gatcctgaac gtgctgtacg gcccggaacga cccgaccatc    1260
tcgccgagct acacctacta ccggcccggg gtgaacctga gcctgagctg ccacgccgcc    1320
agcaaccgc cggcccagta cagctggctg atcgacggca acatccagca gcacaccag      1380
gagctcttca tctcgaacat caccgagaag aacagcggcc tgtacacctg ccaggccaac    1440
aacagcgcga gcggccacag ccggacgacc gtgaagacca tcaccgtcag cgccgagctg    1500
ccgaagccgt cgatcagcag caacaacagc aagccggtgg aggacaagga cgccgtggcc    1560
ttcacctgcg agcccgaggc ccagaacacc acgtacctgt ggtgggtgaa cggccagagc    1620
ctgccggtga gcccgcggtc gcagctctcg aacggcaacc gcaccctgac cctgttcaac    1680
gtgaccgga acgacgcccg ggcgtacgtc tgcgggatcc agaacagcgt gagcgccaac    1740
cggagcgacc cggtgaccct ggacgtgctg tacggcccgg acaccocgat catcagcccc    1800
ccggacagct cgtacctgag cggcgccaac ctcaacctga gctgccacag cgccagcaac    1860
ccgagccgc agtactcgtg gcggatcaac ggcacccgc agcagcacac gcaggtgctg    1920
ttcatcgcca agatcacccc gaacaacaac ggcacctacg cctgcttcgt gagcaacctg    1980
gcgaccggcc ggaacaacag catcgtcaag agcatcaccg tgagcgccag cgggacctcg    2040
cccggcctga gcgccggcgc cacggtgggc atcatgatcg gcgtgctggt gggcgtggcc    2100
ctcatctga                                     2109

```

```

<210> 14
<211> 945
<212> ADN
<213> Artificial

```

```

<220>
<223> Descripción de secuencia (véase Figura 14): Secuencia ARN
      (secuencia de inicio con base en el tipo silvestre) que codifica
      para MAGE-A2 (HsMAGE-A2 (familia de antígeno de melanoma A, 2)
      HsMAGE-A2B).

```

```

<400> 14
atgcctcttg agcagaggag tcagcactgc aagcctgaag aaggccttga ggcccaggga      60

```

ES 2 668 926 T3

```

gaggccctgg gcctggtggg tgcgcaggct cctgctactg aggagcagca gaccgcttct 120
tcctcttcta ctctagtgga agttaccctg ggggaggtgc ctgctgccga ctaccagagt 180
cctccccaca gtcctcaggg agcctccagc ttctcgacta ccatcaacta cactctttgg 240
agacaatccg atgagggctc cagcaaccaa gaagaggagg ggccaagaat gtttcccgac 300
ctggagtccg agttccaagc agcaatcagt aggaagatgg ttgagttggt tcattttctg 360
ctcctcaagt atcgagccag ggagccggtc acaaaggcag aaatgctgga gagtgtcctc 420
agaaattgcc aggacttctt tcccgtgac ttcagcaaag cctccgagta cttgcagctg 480
gtctttggca tcgaggtggt ggaagtggtc cccatcagcc acttgtacat ccttgtcacc 540
tgcttgggccc tctcctacga tggcctgctg ggcgacaatc aggtcatgcc caagacaggc 600
ctcctgataa tcgtcctggc cataatcgca atagagggcg actgtgcccc tgaggagaaa 660
atctgggagg agctgagtat gttggaggtg tttgagggga gggaggacag tgtcttcgca 720
catcccagga agctgctcat gcaagatctg gtgcaggaaa actacctgga gtaccggcag 780
gtgcccggca gtgatcctgc atgctacgag ttctgtggg gtccaagggc cctcattgaa 840
accagctatg tgaaagtcct gcaccataca ctaaagatcg gtggagaacc tcacatttcc 900
taccacccc tcgatgaacg ggctttgaga gagggagaag agtga 945

```

<210> 15

<211> 945

<212> ADN

<213> Artificial

<220>

<223> Descripción de secuencia (véase Figura 15): secuencia de ARN estabilizada (GC) que codifica para MAGE-A2 (HsMAGE-A2B GC)

<400> 15

```

atgcccctgg agcagcggag ccagcactgc aagccggagg agggcctcga ggcccgcggg 60
gaggccctgg gcctggtggg ggcgcaggcc cccgccaccg aggagcagca gaccgcctcc 120
agctccagca cgctcgtcga ggtgaccctg ggcgaggtgc ccgcccggga cccccccagc 180
ccgccccact cccccaggg ggccagctcc ttcagcacca ccatcaacta cacgctgtgg 240
cggcagtccg acgagggcag ctccaaccag gaggaggagg gcccccgcat gttcccggac 300
ctcgagagcg agttccagc cgccatctcc cggaagatgg tcgagctggt gcacttctctg 360
ctcctgaagt accgcgcgcg ggagcccgtg accaaggccg agatgctgga gagcgtcctc 420
cgcaactgcc aggacttctt ccccgtgac ttcctcaagg ccagcgagta cctgcagctg 480
gtgttcggga tcgaggtcgt ggaggtggtc cccatctccc acctctacat cctggtgacc 540

```

ES 2 668 926 T3

```

tgcttgggcc tcagctacga cgggctgctg ggcgacaacc aggtgatgcc gaagaccggg    600
ctctgatca  tcgtcctggc catcatcgcc atcgagggcg actgcgcgcc cgaggagaag    660
atctgggagg agctcagcat gctggaggtg ttcgagggcc gggaggactc cgtgttcgcc    720
caccctcgca agctgctcat gcaggacctg gtccaggaga actacctgga gtaccggcag    780
gtgcccggga gcgaccggc  ctgctacgag ttcctctggg gccccgcgc  cctgatcgag    840
acgtcctacg tgaaggtcct gcaccacacc ctcaagatcg ggggcgagcc ccacatcagc    900
taccgcccgc tgcacgagcg ggcctgccc  gagggcgagg agtga                                945

```

<210> 16

<211> 945

<212> ADN

<213> Artificial

<220>

<223> Descripción de secuencia (véase Figura 16): Secuencia ARN (secuencia de inicio con base en el tipo silvestre) que codifica para MAGE-A3 (MAGE-A3 (familia de antígeno de melanoma A, 3) MAGE-A3)

<400> 16

```

atgcctcttg agcagaggag tcagcactgc aagcctgaag aaggccttga ggcccagagga    60
gaggccctgg gcctggtggg tgcgcaggct cctgctactg aggagcagga ggctgcctcc    120
tcctcttcta ctctagttga agtcaccctg ggggaggtgc ctgctgccga gtcaccagat    180
cctccccaga gtcctcaggg agcctccagc ctccccacta ccatgaacta ccctctctgg    240
agccaatcct atgaggactc cagcaaccaa gaagaggagg ggccaagcac cttccctgac    300
ctggagtccg agttccaagc agcactcagt aggaaggtgg ccgagttggt tcattttctg    360
ctcctcaagt atcgagccag ggagccggtc acaaaggcag aaatgctggg gagtgtcgtc    420
ggaaattggc agtatttctt tcctgtgatc ttcagcaaag cttccagttc cttgcagctg    480
gtctttggca tcgagctgat ggaagtggac cccatcggcc acttgtacat ctttgccacc    540
tgcttgggcc tctcctacga tggcctgctg ggtgacaatc agatcatgcc caaggcaggc    600
ctcctgataa tcgtcctggc cataatcgca agagagggcg actgtgcccc tgaggagaaa    660
atctgggagg agctgagtgt gttagaggtg tttgagggga ggaagacag tatcttgggg    720
gatccaaga  agctgctcac ccaacatttc gtgcaggaaa actacctgga gtaccggcag    780
gtccccggca gtgatcctgc atgttatgaa ttcctgtggg gtccaagggc cctcgttgaa    840
accagctatg tgaaagtcct gcaccatag  gtaaagatca gtggaggacc tcacatttcc    900

```

ES 2 668 926 T3

taccacccc tgcattgagtg ggttttgaga gagggggaag agtga 945

<210> 17
 <211> 945
 <212> ADN
 <213> Artificial

<220>
 <223> Descripción de secuencia (véase Figura 17): a secuencia de ARN estabilizada (GC) que codifica para MAGE-A3 (MAGE-A3 GC)

<400> 17
 atgcccttg agcagcgtc gcagcactgc aagccggagg agggcctcga ggcccggggc 60
 gaggccttg gcctggtgg cgcgaggcc ccggccaccg aggagcagga ggccgccagc 120
 agcagcagca ccctggtgga ggtgaccctg ggcgaggtgc cggccgcgga gagcccggac 180
 ccgccccagt cgccgaggg ggccagcagc ctgccgacca cgatgaacta cccgctctgg 240
 agccagagct acgaggacag ctgaaccag gaggaggagg gcccgagcac cttcccggac 300
 ctggagagcg agttccaggc cgccctgagc cggaaggtgg ccgagctggt ccaacttctg 360
 ctgctcaagt accgggcccg ggagcccgtg accaaggcgg agatgctggg cagcgtggtg 420
 ggcaactggc agtacttctt cccggtgatc ttcagcaagg cctcgagcag cctgcagctg 480
 gtgttcggca tcgagctgat ggaggtcgac ccgatcggcc acctgtacat cttoGCCacc 540
 tgcttcgggc tgagctacga cggcctgctg ggcgacaacc agatcatgcc gaaggccggc 600
 ctgctgatca tcgtgctcgc catcatcgc cgggagggcg actgcccgcc ggaggagaag 660
 atctgggagg agctgagcgt gctggagggtg ttcgagggcc gcgaggacag catcctgggg 720
 gacccgaaga agctgctgac ccagcacttc gtgcaggaga actacctcga gtaccggcag 780
 gtgcccggct cggacccggc ctgctacgag ttctgtggg gcccgggggc cctggctgag 840
 accagctacg tgaaggtgct gcaccacatg gtgaagatca gcggcggccc gcacatcagc 900
 taccgcccgc tgcacgagtg ggtgctgagg gagggcagg agtga 945

<210> 18
 <211> 429
 <212> ADN
 <213> Artificial

<220>
 <223> Descripción de secuencia (véase Figura 18): Secuencia ARN (secuencia de inicio con base en el tipo silvestre) que codifica para Survivin (Survivin (repetición IAP baculoviral que contiene 5, BIRC5) HsSurvivin(wt));

<400> 18

ES 2 668 926 T3

```

atgggtgccc cgacgttgcc ccctgcctgg cagccctttc tcaaggacca cgcacatctct      60
acattcaaga actggccctt cttggagggc tgcgcctgca ccccgagcg gatggccgag      120
gctggcttca tccactgccc cactgagaac gagccagact tggcccagtg tttcttctgc      180
ttcaaggagc tggaggctg ggagccagat gacgaccca tagaggaaca taaaagcat      240
tcgtccggtt gcgctttcct ttctgtcaag aagcagtttg aagaattaac ccttggtgaa      300
tttttgaaac tggacagaga aagagccaag aacaaaattg caaaggaaac caacaataag      360
aagaaagaat ttgaggaaac tgcaagaaa gtgcgccgtg ccatcgagca gctggctgcc      420
atggattga                                          429

```

```

<210> 19
<211> 429
<212> ADN
<213> Artificial

```

```

<220>
<223> Descripción de secuencia (véase Figura 19): secuencia de ARN
estabilizada (GC) que codifica para Survivin (HsSurvivin(GC))

```

```

<400> 19
atgggcgccc ccaccctgcc gccggcctgg cagccgttcc tcaaggacca cgcacatctcg      60
accttcaaga actggccggt cctggagggc tgcgcgtgca ccccgagcg gatggccgag      120
gccggcttca tccactgccc caccgagaac gagccggacc tggcccagtg cttcttctgc      180
ttcaaggagc tggagggctg ggagccggac gacgaccga tcgaggagca caagaagcac      240
agcagcggct gcgcttctc gagcgtgaag aagcagttcg aggagctgac gctcggggag      300
ttctgaagc tggaccgga gcgggccaag aacaagatcg cgaaggagac caacaacaag      360
aagaaggagt tcgaggagac cgccaagaag gtgcggcggg ccatcgagca gctggccgcc      420
atggactga                                          429

```

```

<210> 20
<211> 543
<212> ADN
<213> Artificial

```

```

<220>
<223> Descripción de secuencia (véase Figura 20): Secuencia ARN
(secuencia de inicio con base en el tipo silvestre) que codifica
para NY-ESO-1 (Homo sapiens NY-ESO-1 (NY-ESO-1(wt)));

```

```

<400> 20
atgcaggccg aaggccggg cacaggggt tgcagggcg atgctgatgg ccaggaggc      60
cctggcattc ctgatggccc agggggcaat gctggcggcc caggagaggc ggggtgccacg      120

```

ES 2 668 926 T3

```

ggcggcagag gtccccgggg cgcaggggca gcaagggcct cggggccggg aggaggcgcc 180
ccgcgggggtc cgcattggcg cgcggcttca gggctgaatg gatgctgcag atgcgggggcc 240
agggggccgg agagccgcct gcttgagttc tacctcgcca tgcctttcgc gacacccatg 300
gaagcagagc tggcccgcag gaggctggcc caggatgccc caccgcttcc cgtgccaggg 360
gtgcttctga aggagttcac tgtgtccggc aacatactga ctatccgact gactgctgca 420
gaccaccgcc aactgcagct ctccatcagc tctgtctcc agcagcttcc cctggtgatg 480
tggatcacgc agtgctttct gcccggtgtt ttggctcagc ctccctcagg gcagaggcgc 540
taa 543

```

```

<210> 21
<211> 543
<212> ADN
<213> Artificial

```

```

<220>
<223> Descripción de secuencia (véase Figura 21): secuencia de ARN
estabilizada (GC) que codifica para NY-ESO-1 (NY-ESO-1(GC)):

```

```

<400> 21
atgcaggccg agggccggcg caccgggggc tcgaccggcg acgccgacgg gcccgggcggc 60
ccgggcatcc cggacggccc gggcgggaac gggggcggcc cgggcgaggc cggcgccacc 120
ggcgggcggg gcccgcgggg cgcggggccc gcccgggcga gcggccccgg cgggggcgcc 180
ccgcggggcc cgcacggcgg cgcggccagc ggcctgaacg ggtgctgccg gtgcgggccc 240
cgcggccccg agagccggct cctggagttc tacctggcca tgccgttcgc gaccccgatg 300
gaggccgagc tggcccggcg gaggctggcc caggacgccc cgcgctgcc cgtgccgggc 360
gtgctcctga aggagttcac ggtgagcggc aacatcctga ccatccggct gaccgcccgg 420
gaccaccggc agctgcagct gtcgatcagc agctgcctcc agcagctgag cctgctgatg 480
tggatcacc agtgcttct gccggtgttc ctggcccagc cggccagcgg ccagcgccgg 540
tga 543

```

```

<210> 22
<211> 3429
<212> ADN
<213> Artificial

```

```

<220>
<223> Descripción de secuencia (véase Figura 22): Secuencia ARN
(secuencia de inicio con base en el tipo silvestre) que codifica

```

ES 2 668 926 T3

para MAGE-C1 (HsMAGEC1 (familia de antígeno de melanoma C, 1)
HsMAGEC1 (wt))

```

<400> 22
atgggggaca aggatatgcc tactgctggg atgccgagtc ttctccagag ttctcttgag      60
agtcctcaga gttgtcctga gggggaggac tcccagtctc ctctccagat tcccagagat      120
tctcctgaga gcgacgacac cctgtatcct ctccagagtc ctccagagtcg ttctgagggg      180
gaggactcct cggatcctct ccagagacct cctgagggga aggactccca gtctcctctc      240
cagattcccc agagttctcc tgagggcgac gacaccagtc ctctctcca gaattctcag      300
agttctctg aggggaagga ctccctgtct cctctagaga tttctcagag ccctcctgag      360
ggtgaggatg tccagtctcc tctgcagaat cctgagagtt ccttcttctc ctctgcttta      420
ttgagtattt tccagagttc ccctgagagt actcaaagtc cttttgaggg ttttccccag      480
tctgttctcc agattcctgt gagcgccgcc tcctcctcca ctttagtgag tattttccag      540
agttcccctg agagtactca aagtcctttt gagggttttc cccagtctcc actccagatt      600
cctgtgagcc gctccttctc ctccacttta ttgagtattt tccagagttc ccctgagaga      660
actcagagta cttttgaggg ttttgcccag tctcctctcc agattcctgt gagccccctcc      720
tcctcctcca ctttactgag tcttttccag agtttctctg agagaactca gagtactttt      780
gagggttttg cccagtcttc tctccagatt cctgtgagcc cctccttctc ctccacttta      840
gtgagtcttt tccagagttc ccctgagaga actcagagta cttttgaggg ttttccccag      900
tctcctctcc agattcctgt gagctcctcc tcctcctcca ctttattgag tcttttccag      960
agttcccctg agagaactca cagtactttt gagggttttc cccagtctct tctccagatt     1020
cctatgacct cctccttctc ctctacttta ttgagtattt tccagagttc tctgagaggt     1080
gctcaaagta cttttgaggg ttttccccag tctcctctcc agattcctgg gagccccctcc     1140
ttctcctcca ctttactgag tcttttccag agttcccctg agagaactca cagtactttt     1200
gagggttttc cccagtctcc tctccagatt cctatgacct cctccttctc ctctacttta     1260
ttgagtattt tacagagttc tctgagaggt gctcaaagtg cttttgaggg ttttccccag     1320
tctcctctcc agattcctgt gagctcctct ttctcctaca ctttattgag tcttttccag     1380
agttcccctg agagaactca cagtactttt gagggttttc cccagtctcc tctccagatt     1440
cctgtgagct cctcctcctc ctctccact ttattgagtc ttttccagag ttccccctgag     1500
tgtactcaaa gtacttttga gggttttccc cagtctcctc tccagattcc tcagagtcct     1560
cctgaagggg agaataccca ttctcctctc cagattgttc caagtcttcc tgagtggggag     1620
  
```


ES 2 668 926 T3

gactccctgt ctccacta ctttcctcag agccctcctc agggggagga ctccctatct	1680
cctcactact ttccctcagag ccctcctcag ggggaggact ccctgtctcc tcaactacttt	1740
cctcagagcc ctccaggggga ggactccctg tctcctcact actttcctca gagccctcct	1800
cagggggagg actccatgtc tctctctac tttcctcaga gtcctcttca gggggaggaa	1860
ttccagtctt ctctccagag ccctgtgagc atctgctcct cctccactcc atccagtctt	1920
ccccagagtt tccctgagag ttctcagagt cctcctgagg ggctgtcca gtctcctctc	1980
catagtcttc agagccctcc tgaggggatg cactcccaat ctctctcca gagtctgag	2040
agtgtcctg agggggagga ttccctgtct cctctccaaa ttccctcagag tctcttgag	2100
ggagaggact ccctgtcttc tctccatfff cctcagagtc ctctgagtg ggaggactcc	2160
ctctctctc tccactttcc tcagtttctt cctcaggggg aggacttcca gtcttctctc	2220
cagagtcttg tgagtatctg ctctcctcc acttctttga gtcttcccca gagtttccct	2280
gagagtcttc agagtctcc tgaggggctt gctcagtctc ctctccagag acctgtcagc	2340
tccttcttct cctacacttt agcgagtctt ctccaaagt cccatgagag tccctcagagt	2400
cctcctgagg ggctgcca gtctcctctc cagagtcctg tgagctcctt cccctcctcc	2460
acttcatcga gtctttccca gagttctctt gtgagctcct tccctcctc cacttcatcg	2520
agtctttcca agagttcccc tgagagtcct ctccagagtc ctgtgatctc cttctcctcc	2580
tccacttcat tgagcccatt cagtgaagag tccagcagcc cagtagatga atatacaagt	2640
tcctcagaca ccttgctaga gagtgattcc ttgacagaca gcgagtcctt gatagagagc	2700
gagcccttgt tcacttatac actggatgaa aagggtggacg agttggcgcg gtttcttctc	2760
ctcaaatac aagtgaagca gcctatcaca aaggcagaga tgctgacgaa tgtcatcagc	2820
aggtacacgg gctactttcc tgtgatcttc aggaaagccc gtgagttcat agagatactt	2880
tttggcattt ccctgagaga agtggaccct gatgactcct atgtctttgt aaacacatta	2940
gacctcacct ctgaggggtg tctgagtgat gagcagggca tgtcccagaa ccgcctcctg	3000
attcttattc tgagtatcat cttcataaag ggcacctatg cctctgagga ggtcatctgg	3060
gatgtgctga gtggaatagg ggtgctgtct gggagggagc actttgcctt tggggagccc	3120
agggagctcc tactaaagt ttgggtgcag gaacattacc tagagtaccg ggaggtgccc	3180
aactcttctc ctctcgtta cgaattcctg tggggtccaa gagctcattc agaagtcatt	3240
aagaggaaag tagtagagtt tttggccatg ctaaagaata ccgtccctat tacctttcca	3300
tcctcttaca aggatgcttt gaaagatgtg gaagagagag cccaggccat aattgacacc	3360

ES 2 668 926 T3

acagatgatt cgactgccac agaaagtgca agctccagtg tcatgtcccc cagcttctct 3420
tctgagtga 3429

<210> 23
<211> 3429
<212> ADN
<213> Artificial

<220>
<223> Descripción de secuencia (véase Figura 23): secuencia de ARN estabilizada (GC) que codifica para MAGE-C1 (HsMAGEC1(GC),

<400> 23
atgggcgaca aggacatgcc caccgccggg atgccgagcc tgctccagtc cagctccgag 60
agccccagt cctgccccga gggcgaggac agccagtccc ccctgcagat cccgcagagc 120
tccccgaga gcgacgacac cctgtacccc ctccagtccc cgcagagccg gtccgagggg 180
gaggacagct ccgacccgct gcagcgcccc cccgaggggca aggacagcca gtccccgctg 240
cagatcccgc agagctcccc cgaggggggac gacacgcaga gccccctcca gaacagccag 300
tccagccccg agggcaagga ctccctgagc ccgctggaga tctcccagag ccccccgag 360
ggcgaggacg tgcagtcccc gctccagaac ccggccagct ccttcttcag ctccgcgctg 420
ctgagcatct tccagtccag ccccgagtcc acccagagcc ccttcgaggg gttccccag 480
tccgtcctcc agatcccggg gagcgccgcc tccagcagca ccctggtgtc catcttcag 540
agtcccccg agagcaccca gtcccccttc gagggcttcc cccagagccc gctgcagatc 600
cccgtgtccc ggagcttctc cagcacgctc ctgtccatct tccagagctc ccccgagcgc 660
accagagca ccttcgaggg gttcgcccag tccccgctgc agatccccgt gagccccctc 720
agcagctcca cctcctgag cctgttccag tccttcagcg agcggacgca gtccaccttc 780
gagggcttcg cccagagctc cctccagatc cccgtgagcc cgtccttcag ctccaccctg 840
gtcagcctgt tccagtccag ccccgagcgc acccagtcca cgttcgaggg gttccccag 900
agccccctcc agatcccggg gtccagctcc agcagctcca ccctgctgag cctcttcag 960
tccagccccg agcggacca ctccaccttc gagggcttcc cccagagcct gctgcagatc 1020
ccatgacgt ccagcttctc cagcacctc ctgtccatct tccagagctc cccggagagc 1080
gcgcagtcca ccttcgaggg cttccccag agccccctgc agatccccgg gtccccgagc 1140
ttctccagca cctcctgag cctgttccag tccagccccg agcgcacgca ctccaccttc 1200
gagggcttcc cccagagccc cctccagatc ccgatgacct ccagcttctc cagcaccctg 1260
ctgtccatcc tccagagctc ccccgagagc gccagtcgg ccttcgaggg gttccccag 1320

ES 2 668 926 T3

agccccctgc agatccccggt gtccagctcc ttcagctaca cgctgctctc cctgttccag	1380
agcagccccg agcggacca ctccacctc gagggcttcc cccagagccc gctgcagatc	1440
cccgtgtcca gctccagctc cagctccacc ctctgagcc tgttccagtc cagccccgag	1500
tgcacgcagt ccaccttca gggcttcccc cagagcccgc tgcagatccc ccagtcccc	1560
cccagggggg agaacacca cagcccgctc cagatcgtgc cctccctgcc cgagtgggag	1620
gacagcctgt cccgcacta cttcccgcag agccccccgc agggcgagga cagcctctcc	1680
ccccactact tcccgcagag cccgccccag ggggaggact ccctgagccc ccactacttc	1740
ccgcagtccc cccagggcga ggacagcctg tcccgcact acttccccca gagccccccc	1800
cagggggagg actccatgag ccccctctac tccccagtc ccccgctgca gggcgaggag	1860
ttccagagct ccctgcagag ccccgtgtcc atctgcagct ccagcacccc ctccagcctc	1920
ccgcagagct tcccgcagtc cagccagtc cccccgagg gcccggtcca gagccccctg	1980
cactccccgc agagcccc ggaggggatg cactcccaga gccccctgca gtcccccgag	2040
agcgcccccg agggcgagga ctccctcagc ccgctgcaga tccccagtc cccgctggag	2100
ggggaggaca gcctctccag cctgcacttc ccccagtc ccgcccagtg ggaggacagc	2160
ctgagcccc tccacttccc ccagttccc ccccagggcg aggacttcca gtccagcctg	2220
cagtcccccg tgagcatctg ctccagctcc acgagcctgt ccctccccca gagcttcccg	2280
gagtcccccc agagcccgcc cgaggggccc gcgcagtc ccctgcagcg ccccgtagc	2340
tccttcttca gctacaccct ggcctccctc ctgcagagct cccacgagag cccgcagagc	2400
ccgcccgagg gccccgcca gtccccgctg cagagccccg tgtccagctt cccctccagc	2460
acctccagct ccctcagcca gtccagcccc gtgtccagct tcccgtccag cacctccagc	2520
tcctgagca agagctcccc cgagagcccc ctgcagtc ccgtgatcag cttctccagc	2580
tccacgagcc tctccccgtt cagcgaggag tccagctccc ccgtcgacga gtacaccagc	2640
tccagcgaca ccctgctgga gtccgacagc ctaccgact ccgagagcct gatcgagagc	2700
gagccccctgt tcacctacac gctcgacgag aaggaggag agctggccc gttcctgctc	2760
ctgaagtacc aggtgaagca gccatcacc aaggccgaga tgctgaccaa cgtcatctcc	2820
cgctacaccg gctacttccc ggtgatcttc cggaaggcgc gcgagttcat cgagatcctc	2880
ttcgggatca gcctgcggga ggtggacccc gacgactcct acgtcttctg gaacacgctg	2940
gacctacca gcgagggctg cctgtccgac gagcagggga tgagccagaa ccgctgctc	3000
atcctgatcc tgtccatcat cttcatcaag ggcacctacg ccagcgagga ggtcatctgg	3060

ES 2 668 926 T3

```

gacgtgctct ccgggatcgg cgtgcggggc ggccgcgagc acttcgcctt cggggagccc 3120
ggggagctgc tgaccaaggt ctgggtgcag gagcactacc tcgagtaccg cgaggtgccc 3180
aacagctccc cgccccgta cgagttcctg tggggccccc gcgcccacag cgaggtcatc 3240
aagcgggaagg tgggtggagtt cctggcgatg ctcaagaaca cggccccat caccttcccg 3300
tccagctaca aggacgcctt gaaggacgtg gaggagcggg cccaggccat catcgacacc 3360
accgacgact ccacggccac cgagagcgcg tccagctccg tgatgagccc cagcttctcc 3420
agcgagtga 3429

```

<210> 24

<211> 1596

<212> ADN

<213> Artificial

<220>

<223> Descripción de secuencia (véase Figura 24): secuencia de ARN estabilizada (GC) que codifica para un MAGE-C1 truncado (HsMAGEC1(GC),

<400> 24

```

atgcagtccc cgctgcaggg cgaggagttc cagagctccc tgcagagccc cgtgtccatc 60
tgcagctcca gcacccccctc cagcctcccg cagagcttcc ccgagtccag ccagtcccc 120
cccgagggcc cgggtccagag ccccctgcac tccccgcaga gccccccgga ggggatgcac 180
tcccagagcc ccctgcagtc ccccagagagc gcccccgagg gcgaggactc cctcagcccg 240
ctgcagatcc ccagtcccc gctggagggg gaggacagcc tctccagcct gcacttcccc 300
cagtccccgc ccgagtggga ggacagcctg agccccctcc acttccccca gttcccgc 360
cagggcgagg acttccagtc cagcctgcag tccccctga gcatctgctc cagctccacg 420
agcctgtccc tccccagag cttcccggag tccccccaga gcccgcccga ggggcccggc 480
cagtcccccc tgcagcgc 540
cagagctccc acgagagccc gcagagccc cccgagggcc ccgcccagtc cccgctgcag 600
agccccgtgt ccagcttccc ctccagcacc tccagctccc tcagccagtc cagccccgtg 660
tccagcttcc cgtccagcac ctccagctcc ctgagcaaga gctccccga gagccccctg 720
cagtcccccg tgatcagctt ctccagctcc acgagcctct ccccgttcag cgaggagtcc 780
agctcccccg tcgacgagta caccagctcc agcgacaccc tgctggagtc cgacagcctc 840
accgactccg agagcctgat cgagagcgcg ccctgttca cctacacgct cgacgagaag 900
gtggacgagc tggcccgggt cctgctcctg aagtaccagg tgaagcagcc catcaccaag 960

```

ES 2 668 926 T3

```

gccgagatgc tgaccaacgt catctcccgc tacaccggct acttcccggg gatcttccgg 1020
aaggcgcgcg agttcatcga gatcctcttc gggatcagcc tgcggggagg ggacccccgac 1080
gactcctacg tcttcgtgaa cacgctggac ctcaccagcg agggctgcct gtccgacgag 1140
caggggatga gccagaaccg cctgctcatc ctgatcctgt ccatcatctt catcaagggc 1200
acctacgcca gcgaggaggc catctgggac gtgctctccg ggatcggcgt gcggggccggc 1260
cgcgagcact tcgccttcgg ggagccccgg gagctgctga ccaaggtctg ggtgcaggag 1320
cactacctcg agtaccgca ggtgcccac agctccccgc cccggtacga gttcctgtgg 1380
ggcccccgcg cccacagcga ggtcatcaag cggaaggtgg tggagtctct ggcgatgctc 1440
aagaacacgg tccccatcac cttcccgtcc agctacaagg acgccctgaa ggacgtggag 1500
gagcggggcc aggccatcat cgacaccacc gacgactcca cggccaccga gagcgcgtcc 1560
agctccgtga tgagccccag cttctccagc gactga 1596

```

```

<210> 25
<211> 1122
<212> ADN
<213> Artificial

```

```

<220>
<223> Descripción de secuencia (véase Figura 25): Secuencia ARN
(secuencia de inicio con base en el tipo silvestre) que codifica
para MAGE-C2 (HsMAGE-C2 (familia de antígeno de melanoma C,
2) HsMAGE-C2);

```

```

<400> 25
atgcctcccg ttccaggcgt tccattccgc aacgttgaca acgactcccc gacctcagtt 60
gagttagaag actgggtaga tgcacagcat cccacagatg aggaagagga ggaagcctcc 120
tccgcctctt cactttgta cttagtattt tccccctctt ctttctccac atcctcttct 180
ctgattcttg gtggctctga ggaggaggag gtgccctctg gtgtgatacc aaatcttacc 240
gagagcattc ccagtagtcc tccacagggc cctccacagg gtccttccca gagtcctctg 300
agctcctgct gtcctctttt ttcattggagc tcattcagtg aggagtccag cagccagaaa 360
ggggaggata caggcacctg tcagggcctg ccagacagtg agtcctcttt cacatataca 420
ctagatgaaa aggtggccga gttagtggag ttctgctcc tcaaatacga agcagaggag 480
cctgtaacag aggcagagat gctgatgatt gtcacaaagt acaaagatta ctttctctgtg 540
atactcaaga gagcccgtga gttcatggag cttctttttg gccttgccct gatagaagtg 600
ggccctgacc acttctgtgt gtttgcaaac acagtaggcc tcaccgatga gggtagtgat 660

```

ES 2 668 926 T3

```

gatgagggca tgcccgagaa cagcctcctg attattattc tgagtgtgat cttcataaag      720
ggcaactgtg cctctgagga ggtcatctgg gaagtgtctga atgcagtagg ggtatatgct      780
gggagggagc acttcgtcta tggggagcct agggagctcc tcaactaaagt ttgggtgcag      840
ggacattacc tggagtatcg ggaggtgccc cacagttctc ctccatatta tgaattcctg      900
tggggtccaa gagcccattc agaaagcatc aagaagaaag tactagagtt tttagccaag      960
ctgaacaaca ctgttcctag ttcctttcca tcctggtaca aggatgcttt gaaagatgtg     1020
gaagagagag tccaggccac aattgatacc gcagatgatg ccaactgtcat ggccagtga      1080
agcctcagtg tcatgtccag caacgtctcc ttttctgagt ga                          1122

```

<210> 26

<211> 1122

<212> ADN

<213> Artificial

<220>

<223> Descripción de secuencia (véase Figura 26): secuencia de ARN estabilizada (GC) que codifica para MAGE-C2 (HsMAGE-C2 GC)

<400> 26

```

atgcccccg tgcccggcgt ccccttccgg aacgtggaca acgacagccc cacctccgtg      60
gagctggagg actgggtcga cgcccagcac cgcaccgacg aggaggagga ggaggccagc     120
tccgcgagct ccacgtcta cctggtgttc agcccctcca gcttctccac cagctccagc     180
ctgatcctcg ggggccccga ggaggaggag gtgccctccg gggatcatccc gaacctgacc     240
gagagcatcc cctccagccc cccgcagggc cgcccccagg ggccctccca gagccccctg     300
tccagctgct gcagctcctt cagctggtcc agcttctccg aggagagctc cagccagaag     360
ggcgaggaca ccggcacgtg ccaggggctc ccggactccg agagctcctt cacctacacc     420
ctggacgaga aggtggccga gctggtggag ttcctcctgc tgaagtacga ggccgaggag     480
cccgtcaccg aggccgagat gctcatgata gtgatcaagt acaaggacta cttccccgtg     540
atcctgaagc gcgcccggga gttcatggag ctgctcttcg gcctggcgct gatcgaggtc     600
gggccccgacc acttctgcgt gttcgccaac acggtgggccc tcaccgacga ggggagcgac     660
gacgagggca tgccggagaa ctccctgctg atcatcatcc tcagcgtcat cttcatcaag     720
ggcaactgcg cctccgagga ggtgatctgg gaggtgctga acgccgtcgg ggtgtacgcg     780
ggccgcgagc acttcgtgta cggggagccc cgggagctgc tcaccaaggt ctgggtgcag     840
ggccactacc tggagtaccg cgaggtgccg cacagctccc ccccgtaacta cgagttcctg     900
tggggcccc  gggcccacag cgagtccatc aagaagaagg tcctcgagtt cctggccaag     960

```

ES 2 668 926 T3

ctgaacaaca ccggtgccag cagcttcccc tcctggtaca aggacgcctt caaggacgtc 1020
gaggagcgcg tgcaggccac gatcgacacc ggggacgacg ccacgtgat ggccagcgag 1080
tcctgagcg tcatgtccag caacgtgtcc ttcagcgagt ga 1122

<210> 27
<211> 13
<212> ARN
<213> Artificial

<220>
<223> Descripción de secuencia: secuencia de Kozak (véase descripción p. 36)

<400> 27
gccgccacca ugg 13

<210> 28
<211> 15
<212> ARN
<213> Artificial

<220>
<223> Descripción de secuencia: secuencia estabilizadora genérica (véase descripción p. 36)

<220>
<221> variación
<222> (1)..(1)
<223> /reemplazar="citocina"
/reemplazar="uracil"

<220>
<221> variación
<222> (5)..(5)
<223> /reemplazar="citocina"
/reemplazar="uracil"
/reemplazar="guanosina"
/reemplazar="adenosina", o cualquier otro ácido nucleico

<220>
<221> unidad de repetición
<222> (5)..(5)
<223> x = cualquier número

<220>
<221> variación
<222> (9)..(9)
<223> /reemplazar="uracil"
/reemplazar="adonosina"

<220>
<221> unidad de repetición

<222> (10)..(10)
<223> x = cualquier número

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

<220>
<221> variación
<222> (13)..(13)
<223> /reemplazar="citocina"
/reemplazar="uracil"

<400> 28
nccanccnn ucnc

Reivindicaciones

- 5 **1.** Composición activa inmunoestimuladora que comprende cinco ARN monocistrónicos cada uno codificando un antígeno diferente seleccionado de

 - NY-ESO-1,
 - MAGE-C1,
 - MAGE-C2,
 - 5T4, y
 - Survivina,

10 donde el ARN que codifica NY-ESO-1 comprende una secuencia de ARN según la SEQ ID No 21 o tiene al menos una identidad del 80% con la SEQ ID No 21,

 donde el ARN que codifica MAGE-C1 comprende una secuencia de ARN según la SEQ ID No 24 o tiene al menos una identidad del 80% con la SEQ ID No 24,

15 donde el ARN que codifica MAGE-C2 comprende una secuencia de ARN según la SEQ ID No 26 o tiene al menos una identidad del 80% con la SEQ ID No 26,

 donde el ARN que codifica 5T4 comprende una secuencia de ARN según la SEQ ID No 4 o tiene al menos una identidad del 80% con la SEQ ID No 4,

 donde el ARN que codifica Survivina comprende una secuencia de ARN según la SEQ ID No 19 o tiene al menos una identidad del 80% con la SEQ ID No 19,

20 donde el contenido de G/C de las regiones codificadoras de dichos ARN está aumentado en comparación con el contenido en G/C de las regiones codificadoras de los ARN de tipo natural, no estando modificada la secuencia de aminoácidos codificada de dichos ARN en comparación con la secuencia de aminoácidos codificada de los ARN de tipo natural.

- 25 **2.** Composición activa inmunoestimuladora según la reivindicación 1, donde cada uno de los ARN que codifican NY-ESO-1, MAGEC1, MAGE-C2, 5T4 o Survivina tiene una longitud de 250 a 20.000 nucleótidos.

- 3.** Composición activa inmunoestimuladora según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 2, donde el al menos un ARN es un ARNm.

- 30 **4.** Composición activa inmunoestimuladora según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, que comprende cinco ARN, donde los cinco ARN comprenden

 - SEQ ID No 4 (5T4),
 - SEQ ID No 19 (Survivina),
 - SEQ ID No 21 (NY-ESO-1),
 - SEQ ID No 24 (MAGE-C1) o
 - 35 – SEQ ID No 26 (MAGE-C2)

 o son idénticos en al menos un 95% a cualquiera de las SEQ ID No 4, SEQ ID No 19, SEQ ID No 21, SEQ ID No 24 o SEQ ID No 26, respectivamente.

- 5.** Composición activa inmunoestimuladora según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, donde al menos un ARN está complejado con uno o más policones.

- 40 **6.** Composición activa inmunoestimuladora según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, donde al menos un ARN está complejado con protamina u oligofectamina.

- 7.** Composición activa inmunoestimuladora según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, donde al menos un ARN está complejado con protamina.

- 45 **8.** Composición activa inmunoestimuladora según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, donde la composición activa además comprende al menos un adyuvante, preferentemente seleccionado del grupo de adyuvantes citados en la figura 35.

- 9.** Vacuna que comprende una composición activa inmunoestimuladora según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, donde la composición activa inmunoestimuladora según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8 provoca una respuesta inmune adaptativa.

10. Vacuna según la reivindicación 9, que comprende un vehículo farmacéuticamente aceptable.
11. Uso de una composición activa inmunoestimuladora según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8 o de al menos cinco ARN aislados cada uno codificando un antígeno diferente como se define en cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8 para la preparación de una vacuna para el tratamiento del cáncer pulmonar de células no pequeñas.
12. Uso de una composición activa inmunoestimuladora o de al menos cinco ARN aislados cada uno codificando un antígeno diferente según la reivindicación 11 para la preparación de una vacuna para el tratamiento de los tres subtipos principales de cáncer pulmonar de células no pequeñas, incluyendo carcinoma pulmonar de células escamosas, adenocarcinoma y carcinoma pulmonar de células grandes.
13. Uso de al menos cinco ARN aislados cada uno codificando un antígeno diferente según las reivindicaciones 11 o 12, donde los al menos cinco ARN se administran en paralelo o por separado.
14. Kit que comprende cinco ARN, cada uno codificando un antígeno diferente seleccionado de
- NY-ESO-1,
 - MAGE-C1,
 - MAGE-C2,
 - 5T4, y
 - Survivina,
- donde el ARN que codifica NY-ESO-1 comprende una secuencia de ARN según la SEQ ID No 21 o tiene al menos una identidad del 80% con la SEQ ID No 21, donde el ARN que codifica MAGE-C1 comprende una secuencia de ARN según la SEQ ID No 24 o tiene al menos una identidad del 80% con la SEQ ID No 24, donde el ARN que codifica MAGE-C2 comprende una secuencia de ARN según la SEQ ID No 26 o tiene al menos una identidad del 80% con la SEQ ID No 26, donde el ARN que codifica 5T4 comprende una secuencia de ARN según la SEQ ID No 4 o tiene al menos una identidad del 80% con la SEQ ID No 4, donde el ARN que codifica Survivina comprende una secuencia de ARN según la SEQ ID No 19 o tiene al menos una identidad del 80% con la SEQ ID No 19, donde el contenido de G/C de las regiones codificadoras de dichos ARN está aumentado en comparación con el contenido en G/C de las regiones codificadoras de los ARN de tipo natural, no estando modificada la secuencia de aminoácidos codificada de dichos ARN en comparación con la secuencia de aminoácidos codificada de los ARN de tipo natural.
15. Kit según la reivindicación 14, donde los cinco ARN comprenden
- SEQ ID No 4 (5T4),
 - SEQ ID No 19 (Survivina),
 - SEQ ID No 21 (NY-ESO-1),
 - SEQ ID No 24 (MAGE-C1) o
 - SEQ ID No 26 (MAGE-C2)
- o son idénticos en al menos un 95% a cualquiera de las SEQ ID No 4, SEQ ID No 19, SEQ ID No 21, SEQ ID No 24 o SEQ ID No 26.
16. Kit según las reivindicaciones 14 o 15 para su uso en el tratamiento de cáncer de pulmón de células no pequeñas.
17. Kit para su uso según la reivindicación 16, donde el cáncer de pulmón de células no pequeñas incluye los tres subtipos principales de carcinoma pulmonar de células escamosas, adenocarcinoma y carcinoma pulmonar de células grandes.
18. Kit para su uso según cualquiera de las reivindicaciones 16 o 17, donde el kit es un kit de partes, cada parte conteniendo un ARN diferente para la administración por separado.

ES 2 668 926 T3

ATGACACCGGGCACCCAGTCTCCTTTCTTCCTGCTGCTGCTCCTCACAGTGCTTACAGTTGTTACAGGTTCTG
GTCATGCAAGCTCTACCCCAGGTGGAGAAAAGGAGACTTCGGCTACCCAGAGAAGTTCAGTGCCCAGCTCTAC
TGAGAAGAATGCTGTGAGTATGACCAGCAGCGTACTCTCCAGCCACAGCCCCGGTTCAGGCTCCTCCACCACT
CAGGGACAGGATGTCACCTCTGGCCCCGGCCACGGAACCAGCTTCAGGTTTCAGCTGCCACCTGGGGACAGGATG
TCACCTCGGTCCCAGTCACCAGGCCAGCCCTGGGCTCCACCACCCCGCCAGCCACGATGTCACCTCAGCCCC
GGACAACAAGCCAGCCCCGGGCTCCACCGCCCCCCCCAGCCACGGTGTACCTCGGCCCCGGACACCAGGCCG
GCCCCGGGCTCCACCGCCCCCCCCAGCCACGGTGTACCTCGGCCCCGGACACCAGGCCGGCCCCGGGCTCCA
CCGCCCCCCCCAGCCACGGTGTACCTCGGCCCCGGACACCAGGCCGGCCCCGGGCTCCACCGCCCCCCCCAGC
CCACGGTGTACCTCGGCCCCGGACACCAGGCCGGCCCCGGGCTCCACCGCCCCCCCCAGCCACGGTGTACCC
TCGGCCCCGGACACCAGGCCGGCCCCGGGCTCCACCGCCCCCCCCAGCCACGGTGTACCTCGGCCCCGGACA
ACAGGCCCGCCTTGGGCTCCACCGCCCCCTCCAGTCCACAATGTACCTCGGCCCTCAGGCTCTGCATCAGGCTC
AGCTTCTACTCTGGTGCACAACGGCACCTCTGCCAGGGTACCACAACCCAGCCAGCAAGAGCACTCCATTC
TCAATTCCCAGCCACCACCTCTGATACTCCTACCACCCTTGCCAGCCATAGCACCAAGACTGATGCCAGTAGCA
CTCACCATAGCTCGGTACCTCCTCTCACCTCCTCCAATCACAGCACTTCTCCCCAGTTGTCTACTGGGGTCTC
TTTCTTTTTCTGTCTTTTTACATTTCAAACCTCCAGTTTAATTCCTCTCTGGAAGATCCCAGCACCGACTAC
TACCAAGAGCTGCAGAGAGACATTTCTGAAATGTTTTTGAGATTTATAAACAAGGGGTTTTCTGGGCCTCT
CCAATATTAAGTTCAGGCCAGGATCTGTGGTGGTACAATTGACTCTGGCCTTCCGAGAAGGTACCATCAATGT
CCACGACGTGGAGACACAGTTCAATCAGTATAAAACGGAAGCAGCCTCTCGATATAACCTGACGATCTCAGAC
GTCAGCGTGAGTGTGTCATTTCTTTCTCTGCCAGTCTGGGGCTGGGGTGCCAGGCTGGGGCATCGCGC
TGCTGGTGTGTTCTGTGTTCTGGTTGCGCTGGCCATTGTCTATCTCATTGCCTTGGCTGTCTGTGAGTCCG
CCGAAAGAACTACGGGCAGCTGGACATCTTTCCAGCCGGGATACCTACCATCCTATGAGCGAGTACCCACC
TACCACACCCATGGGCGCTATGTGCCCCCTAGCAGTACCGATCGTAGCCCCTATGAGAAGGTTTTCTGCAGGTA
ACGGTGGCAGCAGCCTCTCTTACACAAACCCAGCAGTGGCAGCCGCTTCTGCCAAGTTG**TAG**

FIG. 1

ATGACCCCGGGCACCAGAGCCCGTTCTTCTGCTCCTGCTGCTCACGGTGCTGACCGTCTGTGACCGGGTCCG
 GCCACGCCAGCTCCACCCCGGGGGCGAGAAGGAGACGAGCGCCACCCAGCGGTCCAGCGTGCCTCCAGCAC
 CGAGAAGAAGCGCGTCTCCATGACCAGCTCCGTGCTGAGCTCCACAGCCCCGGGTCCGGCAGCTCCACGACC
 CAGGGCCAGGACGTGACCCTCGCCCCGGCCACCGAGCCCGCCAGCGGGTCCGCCGCGACGTGGGGCCAGGACG
 TCACCAGCGTGCCCGTGACCCGCCCGCCCTGGGGAGCACACGCGCCCGCCACGACGTACCTCCGCCCC
 CGACAACAAGCCCGCGCCGGGCAGCACCGCCCCCCCCGCCACGGGGTGACCTCCGCCCCCGACACGCGGCCG
 GCCCCCGGCAGCACCGCGCCCCCGCCACGGCGTGACCTCCGCCCCGGACACCCGCCCCGCCCCCGGGAGCA
 CGGCCCGCGCGGCACGGCGTACCTCCGCCCCCGACACCCGGCCCGCCCCGGGAGCACCGCCCCGCCCGC
 CCACGGCGTGACGTCCGCGCCCGACACCCGCCCGGCCCGGCAGCACCGCCCCCCCCGCCACGGGGTGACC
 TCGCCCCCGACACGCGGCCCGCGCCCGGCAGCACCGCCCGCGCGGCCACGGGGTACCTCCGCCCCGACA
 ACCGCCCGCGCTGGGCAGCACCGCCCCCGGTGCACAACGTGACGTCCGCCAGCGGGTCCGCCAGCGGCTC
 CGCCAGCACCTCGTCCACAACGGCACCGAGCGCGGGCCACCACCAGCCCGCTCCAAGAGCACCCCTTC
 TCCATCCCCAGCCACCCTCCGACACCCCGACCACGCTGGCCAGCCACTCCACCAAGACCGACGCCAGCTCCA
 CCCACCACAGCTCCGTGCCCGCTGACGAGCTCCAACCACAGCACCTCCCCCAGCTCAGCACCGGGGTGTC
 CTTCTTCTTCTGAGCTTCCACATCAGCAACCTGCAGTTCAACTCCAGCCTCGAGGACCCGTCCACCGACTAC
 TACCAGGAGCTGCAGCGCGACATCAGCGAGATGTTCTTCTGCAGATCTACAAGCAGGGCGGGTTCTTCCGCTGT
 CCAACATCAAGTTCGGGCCGGGAGCGTCTGTGGTGCAGCTGACGCTCGCGTTCCGCGAGGGCACCATCAACGT
 CCACGACGTGGAGACCCAGTTCAACCAGTACAAGACCGAGGCCGCTCCCGGTACAACCTGACGATCAGCGAC
 GTCTCCGTGAGCGACGTGCCCTTCCCTTCTCCGCCAGAGCGCGCCGGGGTCCCGGGTGGGGGATCGCGC
 TGCTCGTGCTGGTGTGCGTCTGGTGGCCCTCGCCATCGTGTACCTGATCGCCCTGGCGGTCTGCCAGTGCCG
 CCGAAGAACTACGGCCAGCTCGACATCTTCCCCGCCCGGACACCTACCACCCCATGTCCGAGTACCCGACC
 TACCACACCCACGGGGCGGTACGTGCCCCCAGCTCCACGGACCGCAGCCCTACGAGAAGGTGTCCGCCGGCA
 ACGGCGGGAGCTCCCTGAGCTACACCAACCCGGCCGTGCGCGGCCAGCGCCAACCTGTGA

FIG. 2

ES 2 668 926 T3

atgcctgggggggtgctcccggggccccgcccgggggacggggcgtctgcggtggcgcgactagcgtggtac
tcctgggctgggtctcctcgtcttctcccacctcctcggcctcctccttctcctcctcggcgccgttctcctggc
ttccgcccgtgtccgcccagccccgctgcccggaccagtgccccgcgctgtgcgagtgtccgagggcagcgcgc
acagtcaagtgcgttaaccgcaatctgaccgaggtgccacggacctgcccgcctacgtgcgcaacctcttcc
ttaccggcaaccagctggccgtgctccctgcccggcgccttcgcccgcggccgcccgcgtggcggagctggccgc
gctcaacctcagcggcagccgcctggacgaggtgcgcgcgggcgccttcgagcatctgcccagcctgcgccag
ctcgacctcagccacaaccactggccgacctcagtcccttcgctttctcggggcagcaatgccagcgtctcgg
ccccagtccccttgtggaactgatcctgaaccacatcgtgccccctgaagatgagcgggcagaaccggagctt
cgagggcatggtgggtggcggccctgctggcggggcgtgcaactgcaggggctccgcccgttggagctggccagc
aaccacttctttacctgcccgggatgtgctggcccaactgcccagcctcaggcacctggacttaagtaata
attcgtggtgagcctgacctacgtgtccttcgcaacctgacacatctagaaagcctccacctggaggacaa
tgcctcaaggtccttcacaatggcacccctggctgagttgcaaggtctaccccacattagggtttctcctggac
aacaatccctgggtctgcgactgccacatggcagacatgggtgacctggctcaaggaaacagaggtagtgcagg
gcaaagaccggctcacctgtgcatatccggaaaaaatgaggaatcgggtcctccttggaaactcaacagtgtga
cctggactgtgacccgattcttccccatccctgcaaacctcttatgtcttctcctgggtattgttttagccctg
ataggcgtattttctcctcctggttttgtatttgaaccgcaaggggataaaaaagtggtgataaacatcagag
atgctgcagggatcacatggaagggatcattacagatatgaaatcaatgcggaccccagattaacgaacct
cagttctaactcggatgtc**tga**

FIG. 3

ATGCCCGGGGGTGCAGCCGGGGCCCGCCGCGGGGACGGCCGCCTGCGGCTCGCGCGCCTGGCCCTGGTGC
 TCCTGGGGTGGGTCTCCAGCTCCAGC^{CCC}ACCTCCAGCGCCTCCAGCTTCTCCAGCTCCGCC^{CC}CTTCTCTGGC
 CAGCGCGGTGTCCGCCAGCCCCGCTCCCGACCAGTGCCCGCCCTGTGCGAGTGCAGCGAGGCCGCGCGG
 ACCGTGAAGTGCCTCAACCGCAACCTGACGGAGGTGCCACCGACCTCCCGGCCTACGTGCGGAACCTGTTCC
 TGACCGGCAACCAGCTCGCCGTCCTGCCCGCCGGCGCCTTCGCGCGCCGGCCGCCCTGGCCGAGCTCGCCGC
 CCTGAACCTGTCCGGGAGCCGCTCGACGAGGTGCGGGCCGGCGCGTTTCGAGCACCTGCCGTCCCTGCGCCAG
 CTCGACCTGAGCCACAACCCCTGGCCGACCTCTCC^{CC}CTTCGCCTTCAGCGGGAGCAACGCCCTCCGTGAGCG
 CCCCCTCCCGCTGGT^{CG}AGCTGATCCTCAACCACATCGTGCCCCCGAGGACGAGCGGCAGAACCGCAGCTT
 CGAGGGCATGGTGGT^{CG}CGGCCCTGCTGGCCGGGCGGGCCCTCCAGGGCCTGCGCCGGCTGGAGCTCGCCTCC
 AACCACTTCCTGTACCTGCCCGCGACGTGCTCGCGCAGCTGCCGAGCCTGCGGCACCTCGACCTGTCCAACA
 ACAGCCTGGTGTCCCTCACCTACGT^{CAG}CTTCCGCAACCTGACGCACCTGGAGTCCCTCCACCTGGAGGACAA
 CGCCCTGAAGGTGCTGCACAACGGCACCCCTCGCCGAGCTGCAGGGGCTGCC^{CC}ACATCCGGGTGTTCTCTGAC
 AACACCCCTGGGTCTGCGACTGCCACATGGCCGACATGGT^{GAC}CTGGCTGAAGGAGACCGAGGTGGTCCAGG
 GCAAGGACCGCCTGACGTGCGGTACCCCGAGAAGATGCGGAACCGGGTGTCTCTGGAGCTGAACAGCGCCGA
 CCTCGACTGCGACCCGATCCTGCC^{CC}CTCCCTGCAGACCAGCTACGTGTTCTCGGGATCGTCTCTGGCCCTG
 ATCGGCGCCATCTTCCTCTGGTGTGTACCTCAACCGCAAGGGCATCAAGAAGTGGATGCACAACATCCGGG
 ACGCCTGCCCGACACATGGAGGGGTACCACTACCGGTACGAGATCAACGCGGACCCCCGCTGACCAACCT
 GTCCAGCAACTCCGACGTCTGA

FIG. 4

ES 2 668 926 T3

ATGGAGCTGGCGGCTTGTGCCGCTGGGGCTCCTCCTCGCCCTCTTGCCCCCGGAGCCGCGAGCACCCAAG
TGTGCACCGGCACAGACATGAAGCTGCGGCTCCCTGCCAGTCCCGAGACCCACCTGGACATGCTCCGCCACCT
CTACCAGGGCTGCCAGGTGGTGCAGGGAAACCTGGAACCTCACCTACCTGCCACCAATGCCAGCCTGTCTTC
CTGCAGGATATCCAGGAGGTGCAGGGCTACGTGCTCATCGCTCACAACCAAGTGAGGCAGGTCCCCTGCAGA
GGCTGCGGATTGTGCGAGGCACCCAGCTCTTTGAGGACAACCTATGCCCTGGCCGTGCTAGACAATGGAGACCC
GCTGAACAATACCACCCCTGTCACAGGGGCTCCCCAGGAGGCCTGCGGGAGCTGCAGCTTCGAAGCCTCACA
GAGATCTTGAAGGAGGGGTCTTGATCCAGCGGAACCCCCAGCTCTGCTACCAGGACACGATTTTGTGGAAGG
ACATCTTCCACAAGAACAACCAGCTGGCTCTCACACTGATAGACACCAACCCTCTCGGGCCTGCCACCCCTG
TTCTCCGATGTGTAAGGGCTCCCGCTGCTGGGGAGAGAGTTCTGAGGATTGTCAGAGCCTGACGCGCACTGTC
TGTGCCGGTGGCTGTGCCCGCTGCAAGGGGCCACTGCCACTGACTGCTGCCATGAGCAGTGTGCTGCCGGCT
GCACGGGCCCCAAGCACTCTGACTGCCTGGCTGCCTCCACTTCAACCACAGTGGCATCTGTGAGCTGCACTG
CCCAGCCCTGGTCACTACAACACAGACACGTTTGTAGTCCATGCCCAATCCCCGAGGGCCGGTATACATTCGGC
GCCAGCTGTGTGACTGCCTGCCCTACAACCTACCTTTCTACGGACGTGGGATCCTGCACCCCTGCTGCCCTC
TGCACAACCAAGAGGTGACAGCAGAGGATGGAACACAGCGGTGTGAGAAGTGCAGCAAGCCCTGTGCCCGAGT
GTGCTATGGTCTGGGCATGGAGCACTTGCAGAGGTGAGGGCAGTTACCAGTGCCAATATCCAGGAGTTTGTGCT
GGCTGCAAGAAGATCTTTGGGAGCCTGGCATTCTGCCGGAGAGCTTTGATGGGGACCCAGCCTCCAACACTG
CCCCGCTCCAGCCAGAGCAGCTCCAAGTGTGAGACTCTGGAAGAGATCACAGGTTACCTATAACATCTCAGC
ATGGCCGGACAGCCTGCCTGACCTCAGCGTCTTCCAGAACCTGCAAGTAATCCGGGGACGAATTCTGCACAAT
GGCGCCTACTCGCTGACCCTGCAAGGGCTGGGCATCAGCTGGCTGGGGCTGCGCTCACTGAGGGAACTGGGCA
GTGGACTGGCCCTCATCCACCATAACACCCACCTCTGCTTCGTGCACACGGTGCCTGGGACCAGCTCTTTCG
GAACCCGCACCAAGCTCTGCTCCACACTGCCAACCGGCCAGAGGACGAGTGTGTGGGCGAGGGCCTGGCCTGC
CACCAGCTGTGCGCCGAGGGCCTGCTGGGGTCCAGGGCCACCCAGTGTGTCAACTGCAGCCAGTTCCCTTC
GGGGCCAGGAGTGCCTGGAGGAATGCCGAGTACTGCAGGGGCTCCCCAGGGAGTATGTGAATGCCAGGCACTG
TTTGCCGTGCCACCCTGAGTGTGAGCCCCAGAATGGCTCAGTGACCTGTTTTGGACCCGAGGGCTGACCAGTGT
GTGGCCTGTGCCACTATAAGGACCCTCCCTTCTGCGTGGCCCGCTGCCCCAGCGGTGTGAAACCTGACCTCT
CCTACATGCCCATCTGGAAGTTTCCAGATGAGGAGGGCGCATGCCAGCCTTGCCCCATCAACTGCACCCACTC
CTGTGTGGACCTGGATGACAAGGGCTGCCCGCCGAGCAGAGAGCCAGCCCTCTGACGTCCATCATCTCTGCG
GTGGTTGGCATTCTGCTGGTCTGGTCTTTGGGGTGGTCTTTGGGATCCTCATCAAGCGACGGCAGCAGAAGA
TCCGGAAGTACACGATGCGGAGACTGCTGCAGGAAACGGAGCTGGTGGAGCCGCTGACACCTAGCGGACGAT
GCCAACCAGGCGAGATGCGGATCCTGAAAGAGACGGAGCTGAGGAAGGTGAAGGTGCTTGGATCTGGCGCT
TTTGGCACAGTCTACAAGGGCATCTGGATCCCTGATGGGGAGAATGTGAAAATTCCAGTGGCCATCAAAGTGT
TGAGGGAAAACACATCCCCCAAAGCCAACAAGAAATCTTAGACGAAGCATACTGATGGCTGGTGTGGGCTC
CCCATATGTCTCCCGCCTTCTGGGCATCTGCCTGACATCCACGGTGCAGCTGGTGACACAGCTTATGCCCTAT
GGCTGCCTCTTAGACCATGTCCGGGAAAACCGCGGACGCCTGGGCTCCCAGGACCTGCTGAACTGGTGTATGC
AGATTGCCAAGGGGATGAGCTACCTGGAGGATGTGCGGCTCGTACACAGGGACTTGGCCGCTCGGAACGTGCT
GGTCAAGAGTCCCAACCATGTCAAATACAGACTTCCGGCTGGCTCGGCTGCTGGACATTGACGAGACAGAG
TACCATGCAGATGGGGCAAGGTGCCATCAAGTGGATGGCGCTGGAGTCCATTCTCCGCCGGCGGTTACCC
ACCAGAGTGTGTGGAGTTATGGTGTGACTGTGTGGGAGCTGATGACTTTTGGGGCCAAACCTTACGATGG
GATCCCAGCCGGGAGATCCCTGACCTGCTGAAAAGGGGGAGCGGCTGCCCCAGCCCCCATCTGCACCATT
GATGCTACATGATCATGGTCAAATGTTGGATGATTGACTCTGAATGTGCGCCAAGATTCCGGGAGTTGGTGT
CTGAATCTCCCGCATGGCCAGGGACCCCCAGCGCTTTGTGGTCTATCCAGAATGAGGACTTGGGCCCAGCCAG
TCCCTTGGACAGCACCTTCTACCGCTCACTGCTGGAGGACGATGACATGGGGGACCTGGTGGATGCTGAGGAG
TATCTGGTACCCAGCAGGGCTTCTTCTGTCCAGACCCTGCCCGGGCGCTGGGGGCATGGTCCACCACAGGC
ACCGCAGCTCATCTACCAGGAGTGGCGGTGGGGACCTGACACTAGGGCTGGAGCCCTCTGAAGAGGAGGCCCC
CAGGTCTCCACTGGCACCCCTCCGAAGGGGCTGGCTCCGATGTATTTGATGGTGGCTGGGAATGGGGGCAGCC
AAGGGCTGCAAAGCCTCCCAACACATGACCCAGCCCTCTACAGCGGTACAGTGGAGACCCACAGTACCC
TGCCCTGTGAGACTGATGGCTACGTTGCCCTGACCTGCAGCCCCAGCCTGAATATGTGAACCAGCCAGA
TGTTCCGGCCCCAGCCCCCTTCGCCCCGAGAGGGCCCTCTGCCTGCTGCCCGACCTGCTGGTGGCACTCTGGAA
AGGCCAAGACTCTCTCCCCAGGGAAGAATGGGGTCTCAAAGACGTTTTTGCCTTTGGGGTGGCGTGGAGA
ACCCCGAGTACTTGACACCCAGGGAGGAGCTGCCCTCAGCCCCACCCTCCTCCTGCCTTTCAGCCCAGCCTT
CGACAACCTCTATTACTGGGACCAGGACCCACCAGAGCGGGGGCTCCACCCAGCACCTTCAAAGGGACACCT
ACGGCAGAGAACCCAGAGTACCTGGGTCTGGACGTGCCAGTGTGA

FIG. 5

ATGGAGCTGGCCGCCCTCTGCCGGTGGGGCCTGCTGCTCGCGCTGCTGCCCCGGGGGCCAGCACCCAGG
 TGTGCACCGGCACGGACATGAAGCTCCGCCTGCCGCCTCCCCGAGACCCACCTGGACATGCTCCGGCACCT
 GTACCAGGGGTGCCAGGTGCTGCAGGGCAACCTGGAGCTCACCTACCTGCCACCAACGCCAGCCTGTCTTC
 CTCCAGGACATCCAGGAGGTGCAGGGGTACGTCTGATCGCGCACAAACCAGGTGCGCCAGGTGCCGCTGCAGC
 GGCTCCGCATCGTCCGGGGCACGCAGCTGTTTCGAGGACAACCTACGCCCTGGCCGTGCTCGACAACGGCGACCC
 CCTGAACAACACCACCCCGTACCAGGGGCGAGCCCGGGGGCTGCGCGAGCTCCAGCTGCGGTCCCTGACG
 GAGATCCTCAAGGGCGGGGTCTGATCCAGCGCAACCCGCAGCTGTGCTACCAGGACACCATCCTCTGGAAGG
 ACATCTTCCACAAGAACAACCAGCTGGCGCTGACCCTCATCGACACCAACCCGGAGCCGCGCCTGCCACCCCTG
 CTCCCCATGTGCAAGGGCAGCCGGTGTGGGGCGAGTCCAGCGAGGACTGCCAGTCCCTGACCGGCACCGTG
 TGGCCGGGGCTGCGCCCGGTGCAAGGGGCCCTGCCGACCGACTGCTGCCACGAGCAGTGGCCGCGGGCT
 GCACCGGCCCAAGCACAGCGACTGCCTGCCTGCCTGCACTTCAACCACTCCGGGACTGTCGAGCTGCACTG
 CCCGCCCTCGTGACGTACAACACCGACACCTTCGAGAGCATGCCAACCCGGAGGCCGCTACACCTTCGGG
 GCCCTCTGCGTACGGCCTGCCCTACAACCTACCTGAGCACCGACGTGGGCTCCTGACCCCTGGTGTGCCCC
 TCCACAACCAGGAGGTACCAGCGGAGGACGGGACGCAGCGGTGCGAGAAGTGCAGCAAGCCCTGCGCCCGCT
 GTGCTACGGCTGGGCATGGAGCACCTGCGGGAGGTGCGCGCCGTACCTCCGCCAACATCCAGGAGTTCGCC
 GGGTGAAGAAGATCTTCGGCAGCCTCGCGTTCTGCGGAGAGCTTCGACGGGGACCCCGCTCCAACACCG
 CCCCCCTGCAGCCCGAGCAGCTGCAGGTGTTTCGAGACCTCGAGGAGATCACGGGCTACCTGTACATCAGCGC
 CTGGCCGACTCCCTGCCGACCTCAGCGTGTTCAGAACCTGCAGGTATCCGGGGGCGCATCTGCACAAC
 GCGCCTACTCCCTACCCTGCAGGGCCTGGGGATCAGCTGGCTCGGCCTGCGGTCCCTGCGGGAGCTCGGGA
 GCGCCTGGCGTGTATCCACCACAACACCCACCTCTGCTTCGTGCACACCGTGCCTGGGACCAGCTGTTCG
 CAACCCACAGGCCCTGCTCCACACGGCCAACCCGGCCGGAGGACGAGTGCCTCGGGGAGGGCCTGGCCTGC
 CACCAGCTGTGCGCGCGGCCACTGCTGGGGGCCCGGCCACCCAGTGCCTGAACCTGCTCCAGTTCCTCC
 GGGGGCAGGAGTGCCTCGAGGAGTGCCTGCTGCAGGGCCTGCCGCGGGAGTACGTGAACGCCCGCCACTG
 CCTCCCTGCCACCCGAGTGCAGCCCAAGAACGGCAGCGTACCTGCTTCGGGGCCGGAGGCCGACCAGTGC
 GTGGCCTGCGCCACTACAAGGACCCGCCCTTCTGCGTGGCGCGGTGCCCTCCGGCGTCAAGCCGGACCTGA
 GCTACATGCCCATCTGGAAGTTCGCCGACGAGGAGGGGGCTGCCAGCCCTGCCCGATCAACTGCACCCACTC
 CTGCGTGGACCTGGACGACAAGGGCTGCCCGCCGAGCAGCGCGCCAGCCCTCACGTCCATCATCAGCGCC
 GTGGTCCGGATCCTGCTGGTGGTGGTCTCGCGTGGTGTTCGGCATCCTGATCAAGCGCGCCAGCAGAAGA
 TCCGGAAGTACACCATGCGCCGGTCTCCAGGAGACCGAGCTGGTTCGAGCTGACCCCGTCCGGGGCATG
 GCCCAACCAGGCCAGATGCGCATCCTCAAGGAGACCGAGCTGCGGAAGGTGAAGGTGCTGGGCAGCGGGGCC
 TTCGGCACGGTCTACAAGGGGATCTGGATCCCCGACGCGGAGAACGTGAAGATCCCGTGGCCATCAAGGTCC
 TCCGCGAGAACACCTCCCCGAAGGCCAACAAGGAGATCCTGGACGAGGCGTACGTGATGGCCGGCGTGGGGAG
 CCCCCTACGTAGCCGGCTGCTCGGCATCTGCCTGACCTCCACCGTGCAGCTGGTGACGCAGCTCATGCCCTAC
 GGGTGCCTGCTGGACCACGTCCGCGAGAACCAGGGCCGGCTCGGGAGCCAGGACCTGCTGAACGGTGCATGC
 AGATCGCCAAGGGCATGTCTACCTCGAGGACGTGCGCTGGTGCACCGGGACCTGGCCGCGCGCAACGTCTT
 CGTGAAAGAGCCCCAACACGTGAAGATCACCGACTTCGGCTGGCCCGGCTGCTCGACATCGACGAGACCGAG
 TACCACGCCGACGGGGCAAGGTCCCGATCAAGTGGATGGCCCTGGAGTCCATCCTGCGCCGGCGCTTACCC
 ACCAGAGCGACGTGTGGTCTACGGGGTGACGGTCTGGGAGCTCATGACCTTCGGCGCAAGCCCTACGACGG
 GATCCCCGCGCGGGAGATCCCGGACCTGCTGGAGAAGGGCGAGCGCCTCCCCAGCCCCCATCTGCACCATC
 GACGTGTACATGATCATGGTGAAGTGTGGATGATCGACAGCGAGTGCCTGGCCCGCTTCCGGGAGCTGGTCT
 CCGAGTTCAGCCGATGGCCCGGGACCCCCAGCGCTTCGTGGTGTATCCAGAACGAGGACCTGGGCCCCCGCTC
 CCCCCTCGACAGCACCTTCTACCGGTCCCTGCTGGAGGACGACGACATGGGGGACCTCGTTCGACCGCGAGGAG
 TACCTGGTCCCGCAGCAGGGCTTCTTCTGCCCGACCCCGCCCGGGGGCGGGCGGCATGGTGCACCACCGCC
 ACCGGAGCTCCAGCACCGCTCCGGGGCGGGGACCTGACCTCGGCCTGGAGCCGAGCGAGGAGGAGGCCCC
 GCGGAGCCCCCTGGCCCCCTCCGAGGGGGCCGGCAGCGACGTCTTCGACGGCGACCTCGGGATGGGCGCCGCG
 AAGGGGTGCAGTCCCTGCCGACCCAGACCCAGCCCCCTCCAGCGCTACTCCGAGGACCCACCGTGCCTG
 TGCCAGCGAGACGGACGGCTACGTGGCCCCCTGACCTGCTCCCGCAGCCGGAGTACGTCAACAGCCCGA
 CGTGCGGGCCCCAGCCCCGAGCCCCGGGAGGGGCCCTCCCGCCCGCCCGCCCGCGGGGCCACCCCTGGAG
 CGGCCAAGACCCTGTCCCCCGCAAGAACGGGGTGGTCAAGGACGTGTTTCGCTTCGGCGGGGCCGTGAGA
 ACCCGGAGTACCTCAGCCCCAGGGCGGGGCCGCGCCCCAGCCCCACCCGCCCCCGCTTCAGCCCCGCTT
 CGACAACCTGTACTACTGGGACCAGGACCCCGCGGAGCGCGGCCCCCCCTCCACCTTCAAGGGCACCCCG
 ACCGCCGAGAACCCCGAGTACCTGGGGCTCGACGTGCCCGTGTGA

FIG. 6

ES 2 668 926 T3

atgccgcgcgctccccgctgccgagccgtgcgctccctgctgcgccagccactaccgcgaggtgctgccgctgg
ccacgttcgtgcgccgctggggccccagggctggcggtggtgcagcgccggggaaccggcggtttccgcgc
gctgggtggcccagtgctggtgtgctgcccgggacgcacggccgccccccgcgccccctccttccgccag
gtgtcctgcctgaaggagctgggtggcccagtgctgcagaggctgtgagcgccggcggaagaacgtgctgg
ccttcggccttcgctgctggacggggcccgggggcccccccgaggccttcaccaccagcgtgcgagctg
cctgcccaacacgggtgaccgacgactgccccgggagcggggcggtgggggctgctgctgcccgcgctggggc
gacgtgctggttcacctgctggcagcgtgcgcgctctttgtgctgggtggctcccagctgcccctaccaggtg
gccccgcccgtgtaccagctcggcgctgccactcaggccccggccccccgcccacacgctagtggaccgccgaag
gcgtctgggatgccaacgggcctggaacctagcgtcagggaggccgggggtccccctgggctgccagccccg
ggtgagaggaggcgccggggcagtgccagccgaagtctgcccgttgcccaagaggcccaggcgtggcgctgcc
ctgagccggagcggacgcccgttgggacggggctcctggggcccaccgggacaggacgctggaccgagtgaccg
tggtttctgtgtggtgtcacctgccagaccgcccgaagaagccacctctttggagggtgctctctggcag
cgccactcccaccatccgtgggcccagcaccacgccccccatccacatcgccggccaccacgctccct
gggacagccttgcctcccggtgtacgcccagaccgaagcacttccctactcctcaggcgacaaggagcgt
gccccctccttccactcagctctctgaggcccagcctgactggcgctcggaggctcgtggagaccatcttt
ctgggttccaggccctggatgccagggactccccgcaggttgccccgcctgccccagcgtactggcaaatgc
ggccccgtttctggagctgcttgggaaccacgcgcagtgcccctacgggtgctcctcaagacgcactgcc
gctgagagctgcccgtcaccacagcagccgggtgtctgtgcccgggagaagcccagggtctgtggcgcccc
gaggaggaggacacagacccccgtgcctggtgcagctgctccgcccagcagcagccccctggcaggtgtacg
gcttcgtgcccgtgctgctgcccggctgggtgccccagggcctctggggctccaggcacaacgaacgcccgtt
cctcaggaacaccaagaagtccatctccctgggggaagcatgccaaagctctcgtgagggagctgacgtggaag
atgagcgtgcccagctgctgcttggctgcccagggagcccaggggttggctgtgttccggccgcagagcaccgtc
tgctgagggagatcctggccaagtccctgcactggctgatgagtggtacgtcgtcgagctgctcaggtcttt
ctttatgtcacggagaccagtttcaaaagaacaggctcttttctaccggaagagtgtctggagcaagtgg
caaagcattggaatcagacagcacttgaagagggtgagctgcccgggagctgtcggaaagcagaggctcaggcagc
atccgggaagccaggccccgcctgctgacgtccagactccgcttccatccccaaagcctgacgggctgcccgcgat
tgtgaacatggactacgtcgtgggagccagaacgttccgcagagaaaagaggccgagcgtctcacctcgagg
gtgaaggcactgttcagcgtgctcaactacgagcggggcgccggcccccggcctcctggggcgtctgtgctgg
gctggacgatccacaggccctggcgccacttctgtgctgctgctgcccggccaggaccgcccgcctgagct
gtactttgtcaagtggtggtgacggggcgctacgacaccatccccaggacaggctcagggaggtcatcgcc
agcatcatcaaacccagaacacgactgctgctgctgctggatcccggtgggtccagaaggccgcccacggcag
tccgcaaggccttcaagagccacgtctctaccttgacagacctccagcctgacatgagcaggtcgtggctca
cctgagggagaccagccccgctgagggatgcccgtcgtcatcgagcagagctcctccctgaatgaggccagcag
ggcctcttcagcgtcttccctacgcttcatgtgccaccacgcccgtgcccacatcaggggcaagtccctacgtccag
gccaggggatccccgagggctccatcctctccacgctgctctgcagcctgtgctacggcgacatggagaacaa
gctgtttgccccgattccggcgggacgggctgctcctgctgcttgggtggatgatttctgttgggtgacacctc
ctcaccacgcgaaaaccttccctcaggaccctgggtccgaggtgtccctgagtatggctgctggtgaaacttgc
ggaagacagtggtgaaacttccctgtagaagacgaggccctgggtggcagggcttttgggtcagatgcccggcca
cggcctattcccctgggtgcccgtgctgctggataccccggaccctggagggtgagagcgactactccagctat
gccccgacctccatcagagccagctcaccttcaaccgcccgttcaaggctgggaggaacatgctgctgcaaac
tctttggggtcttggcgctgaagtgtcacagcctgtttctggatgttgaggtgaacagcctccagacgggtgtg
caccaacatctacaagatcctcctgctgagggcgtacaggtttcacgcatgtgtgctgagctccatctccatcc
cagcaagtttggagaacccccacatcttctgcccgtcactctctgacacggcctccctctgctactccatcc
tgaaagccaagaacgcagggatgtcgtgcccccaagggcgccgcccggcctctgcccctccgagggcgtgca
gtggctgtgccaccaagcattcctgctcaagctgactcgacaccgtgtcacctacgtgccactcctgggggtca
ctcaggacagcccagacgagctgagtcggaagctccccgggacgacgctgactgcccctggaggccgcagcca
accggcactgcccctcagacttcaagacctcctggactga

FIG. 7

ATGCCCGGGGCCCCGCGCTGCCGGGCGGTGCGCAGCCTGCTCCGGTCCCCTACTACCGCGAGGTCTGCCCTGG
 CGACCTTCGTGCGGCGCCTCGGCCCCAGGGGTGGCGGCTGGTGCAGCGCGGCGACCCCGCCGCTTCGGGC
 CCTGGTGCAGTGCCTCGTGTGCGTGGCGTGGGACGCGCGCCCGCCCGCCCGCCGAGCTTCGGCAG
 GTCTCCTGCCTGAAGGAGCTGGTGGCCCGGTGCTCCAGCGGCTGTGCGAGCGCGGGGCGAAGAAGCTCCTGG
 CCTTCGGCTTCGCCCTCCTGGACGGGGCCCGGGGCGGCCCCCGAGGCCTTACCACAGAGCGTGCCTCCTA
 CCTGCCAACACCGTGACCGACGCGCTCCGGGGGAGCGGCGCCTGGGGGCTGCTGCTCCGCCGGGTCCGGCAG
 GACGTGCTGGTGCACCTGCTCGCCCGCTGCGCCCTGTTCTGCTCCTGGTGGCCCGTCTGCGCGTACCAGGTGT
 GCGGGCCCCGCTTACCAGCTGGGCGCCGCCACCCAGGCCCGGCCCCCGCCCGCCAGCCAGCGGCCCGGGCG
 CCGGCTGGGGTGCAGCGCGCGTGAACACTCCGTCCGGGAGGCCGGCGTGCCTCCTGGGCTGCCGGCCCC
 GCGCCCGCCGGGCGCGCGGGAGCGCCTCCGGAGCCTGCCCTCCCAAGCGCCCGCGGCGGGCGCGGCC
 CCGAGCCGAGCGGACGCCCGTGGGGCAGGGCTCCTGGGCCACCCGGGGCGCACCCGGGGCCAGCGACCC
 CGGCTTCGTGCTGTCCCGCCCGGCGGCGGAGGAGGCCACCAGCCTGGAGGGGGCCCTGTCCGGCACC
 CGCCACAGCCACCCCTCCGTGGGGCGGCGAGCACCAGCCGGGCCCCCGAGCACAGAGCCCGCCCGCCCGCCCT
 GGGACACCCCTGCCCGCCGCTTACGCCGAGACCAAGCACTTCTCTACTCCAGCGGGGACAAGGAGCAGCT
 GCGGCCCTCCTTCTGCTCAGCTCCCTGCGCCCCAGCCTGACCGGCGCGCGGCGCCTCGTGGAGACGATCTTC
 CTGGGCTCCCGGCCGTGGATGCCCGGGACCCCGCGCCGGCTGCCCGCCTCCCGCAGCGGTACTGGCAGATGC
 GCCCCCTGTTCTGGAGCTCCTGGGCAACCACGCCAGTGGCCCTACGGGGTCTGCTGAAGACCCACTGCCC
 CCTCCGGGCCCGCGTACCAGCGCGCGGGCGTGTGCGCCCGCGAGAAGCCCGAGGGGAGCGTCCCGCCCC
 GAGGAGGAGGACACGACCCCGCGCCTGGTGCAGTGTCTCCGGCAGCACTCCAGCCCGTGGCAGGTGTACG
 GCTTCGTCCGCGCCTGCCTGCGGCGCCTGGTGGCCCCGGCCTCTGGGGTCCCGGCACAACGAGCGCCGGTT
 CCTGCGCAACCAAGAAGTTCATCAGCCTGGGCAAGCACGCGAAGCTTCCCTGCAGGAGCTGACCTGGAAG
 ATGAGCGTGCGGGACTGCGCCTGGCTCCGGCGCTCCCGGGGGTCCGGTGCCTGCCCGCCGCGAGCACCGGC
 TGCGCGAGGAGATCCTGGCGAAGTTCCTCCACTGGCTGATGAGCGTGTACGTGCTGGAGCTGCTCCGGTCTT
 CTTCTACGTGACCGAGACGACCTTCCAGAAGAACCGCCTGTTCTTCTACCGGAAGAGCGTCTGGTCCAAGCTG
 CAGAGCATCGGCATCCGCCAGCACCTCAAGCGGGTGCAGCTGCGCGAGCTGAGCGAGGCCGAGGTCCGGCAGC
 ACCGCGAGGCCCGGCCCGCCCTCCTGACCTCCCGCCTGCGGTTTATCCCAAGCCGGACGGGCTCCGCCCAT
 CGTCAACATGGACTACGTGGTGGGCGCCCGGACCTTCCGCGGGGAGAAGCGCGCGGAGCGGCTGACGAGCCGG
 GTCAAGGCCCTGTTCTCCGTGCTCAACTACGAGCGCGCCCGGCGCCCGGGTCTGTTGGGCGCCAGCGTGTCTG
 GGCTGGACGACATCCACCGGGCTGGCGCACCTTCTGCTTCCGGGTGCGCGCGCAGGACCCCGCCCGAGCT
 CTACTTCGTGAAGGTGACGTGACCGGCGCCTACGACACCATCCCCAGGACCGGCTGACGGAGGTGATCGCC
 TCCATCATCAAGCCCCAGAACACCTACTGCGTCCGCCGTTACGCCGTGGTGCAGAAGGCCGCGCACGGCCACG
 TCCGCAAGGCCCTCAAGAGCCACGTGTCCACCCTGACCGACCTCCAGCCGTACATGCGGCAGTTCTGGGCCA
 CCTGCAGGAGACGAGCCCCCTGCGCGACGCGCTCGTGATCGAGCAGTCCAGCTCCCTCAACGAGGCGAGCTCC
 GGGCTGTTGACGCTGTTCTGCGGTTTATGTGCCACCACGCCGTCCGCATCCGGGGCAAGAGCTACGTGCAGT
 GCCAGGGGATCCCCAGGGCTCCATCCTCAGCACCTGCTGTGCTCCCTCTGCTACGGGGACATGGAGAACAA
 GCTGTTCCGCGGCATCCGCGGGACGGCCTGCTCCTGCGCCTGGTGGACGACTTCTCTGCTGTAACCTGC
 CTGACCCACGCCAAGACGTTCTCCGGACCCTGGTGCAGGGGTGCCGGAGTACGGCTGCGTCTGTAACCTGC
 GGAGACCGTGGTCAACTTCCCGTGGAGGACGAGGCCCTCGGGGGCACCGCGTTCGTGCGAGATGCCCGCCA
 CGGGCTGTTCCCTGGTGGCGCCTGCTCCTGGACACCCGGACGCTGGAGGTCCAGAGCGACTACAGCTCCTAC
 GCCCGCACAGCATCCGGGCCCTCCCTCACCTTCAACCGCGGCTTCAAGGCCGGGCGGAACATGCGCCGGAAGC
 TGTTCCGGCTGCTGCGCCTCAAGTGCCACAGCCTGTTCTGGACCTCCAGGTCAACTCCCTGCAGACCGTGTG
 CACGAACATCTACAAGATCCTGCTCCTGCAGGCGTACCAGGTTCCACGCCTGCGTGTGCTGAGCTCCCGTTCAC
 CAGCAGGTCTGGAAGAACCCACCTTCTTCTGCGCGTATCAGCGACACCGCCTCCCTGTGCTACAGCATCC
 TCAAGGCCAAGAACCGCGGGATGTCCCTGGGCGCAAGGGGGCCCGCGGCCCTGCCAGCGAGGCCGTGCA
 GTGGCTCTGCCACCAGCCCTTCTGCTGAAGCTCACCCGGCACCGCGTACGTACGTGCGCTGCTGGGCTCC
 CTCCGGACCGCGCAGACCCAGCTGAGCCGCAAGCTGCCGGGACACGCTCACCGCCCTGGAGGCCCGCCGCA
 ACCCGCCCTGCCCTCCGACTTCAAGACCATCCTCGACTGA

FIG. 8

ES 2 668 926 T3

ctgcaggaccggcctccacgtgtgtcccggagccggcggtctcagcacacggtccggtccgggacctgggtgcc
tacagcagccagagcagcagggagtcggggaccggggcgcatctgggccaagttagggcgccgagggccag
cgctgaacgtctccagggccggaggagccgcgggggcgctccgggtctgagccgcagcaaatgggctccgacgtg
cgggacctgaacgcgctgctgcccgcgctcccctccctgggtggcgggcggtgctgcccctgctgtgagcg
gcgcggcgagtgggcgccggtgctggactttgcgccccggggcgcttcgggttacgggtcggtggggcgccc
cgcgccgccaccggctccgcccaccaccggcgccgcccctcactccttcatcaaacaggagccgagctgg
ggcgggcgggagccgcacgaggagcagtgccctgagcgccttcaactgtccacttttccggccagttcaactggca
cagccggagcctgtcgtacggggcccttcggtcctcctccgcccagccagggcgtatccggccagggccaggat
gtttcctaacgcgcccctacctgcccagctgcctcgagagccagcccgtatctcgcaatcaggggttacagcacg
gtcaccttcgacgggacgcccagctacgggtcacacgcccctcgcaccatgcgggcgagttcccccaaccactcat
tcaagcatgaggatcccatgggcccagcagggctcgctgggtgagcagcagtagtactcgggtgcccggccgggtcta
tggctgccacacccccaccgacagctgcaccggcagccaggctttgctgctgaggacgcccctacagcagtgac
aatttataccaaatgacatcccagcttgaatgcatgacctggaatcagatgaacttaggagccaccttaaagg
gagttgctgctgggagctccagctcagtgaaatggacagaagggcagagcaaccacagcacagggtagagag
cgataaccacacaacgcccctcctctgcggagcccaatacagaatacacacgcacgggtgcttcagagggcatt
caggatgtgacgctgtgcctggagtagccccgactccttgtagcggtcggcatctgagaccagtgagaaacgcc
ccttcatgtgtgcttaccaggctgcaataagagatatTTTTAAGCTGTCCCACTTACAGATGCACAGCAGGAA
GCACACTGGTGAGAAACCATAACCAGTGTGACTTCAAGGACTGTGAACGAAGGTTTTCTCGTTCAGACCAGCTC
AAAAGACACCAAAGGAGACATACAGGTGTGAAACCATTCCAGTGTAAAATTGTCAAGCGAAAGTTCTCCGGT
CCGACCACCTGAAGACCCACACCAGGACTCATAAGGTAAAACAAGTGAAAAGCCCTCAGCTGTGGTGGCC
AAGTTGTGAGAAAAGTTTGCCGGTCAGATGAATTAGTCCGCCATCACAACATGCATCAGAGAAACATGACC
AACTCCAGCTGGCGCTTTGA

FIG. 9

ES 2 668 926 T3

ATGCAGGACCCCGCCAGCACCTGCGTGCCGGAGCCCGCCTCCCAGCACACCCTCCGGAGCGGCCCCGGGTGCC
TGCAGCAGCCCGAGCAGCAGGGCGTCCGCGACCCGGCGGGATCTGGGCGAAGCTGGGGGCCCGCAGGCCTC
CGCCGAGCGGCTCCAGGGCCCGCGGAGCCGCGGCGCGTCCGGGAGCGAGCCCAGCAGATGGGCTCCGACGTG
CGGGACCTGAACGCCCTGCTCCCCGCCGTGCCAGCCTGGGCGGCGGGGGCGGGTGCGCCCTGCCGCTCCG
GGGCGGCCAGTGGGCCCCCGTGCTCGACTTC**GCTCCTCCAGGAGCTAGCGCTTACGGATCTCTGGGAGGACC**
TGCTCCTCCACCCGCTCCGCCACCTCCTCCACCACCTCCACCTCACAGCTTCATCAAGCAGGAGCCCTCCTGG
GGCGGCGCCGAGCCCCACGAGGAGCAGTGCCTGAGCGCCTTACCGGTGCACTTCTCCGGGCAGTTACCCGGGA
CCGCGGGGGCCTGCCGCTACGGCCCTTCGGCCCGCCCCCGGAGCCAGGCCTCCAGCGGGCAGGCCCGGAT
GTTCCCAACGCCCCCTACCTCCCTCCTGCCTGGAGAGCCAGCCGGCGATCCGCAACCAGGGCTACAGCACC
GTCACGTTTCGACGGGACCCCTCCTACGGCCACACCCAGCCACCACGCCGCCAGTTCCCAACCACTCCT
TCAAGCACGAGGACCCGATGGGGCAGCAGGGCAGCCTGGGCGAGCAGCAGTACTCCGTGCCCGCCCGTGT
CGGGTGCCACACCCGACGGACAGCTGCACCCGGCTCCAGGCCCTCCTGCTGCGGACCCCTACAGCTCCGAC
AACCTCTACCAGATGACCAGCCAGCTGGAGTGCATGACGTGGAACCAGATGAACCTGGGGGCCACCCCTCAAGG
GCGTCGCGGCCGGGTCCAGCTCCAGCGTGAAGTGGACCGAGGGCCAGTCCAACCACAGCACCAGGCTACGAGTC
CGACAACCACACGACCCCATCCTGTGCGGGGCCAGTACCGCATCCACACCCACGGCGTGTTCGGGGGATC
CAGGACGTCCGCGGGGTGCCCGGCGTGGCCCGACCCCTGGTCCGCGAGCGCTCCGAGACGAGCGAGAAGCGGC
CCTTCATGTGCGCCTACCCCGGCTGCAACAAGCGCTACTTCAAGCTCAGCCACCTGCAGATGCACTCCCGGAA
GCACACCGGGGAGAAGCCCTACCAGTGCGACTTCAAGGACTGCGAGCGCCGGTTTCCAGCCGCTCCGACCAGCTG
AAGCGGCACCAGCGGCACACCCGGCGTGAAGCCGTTCCAGTGCAGACCTGCCAGCGGAAGTTTCCAGCCGCT
CCGACCACCTCAAGACGCACACCCGGACCCACACCCGGGAAGACGAGCGAGAAGCCCTTCTCCTGCCGCTGGCC
CAGCTGCCAGAGAAGTTGCCCGGTCCGACGAGCTGGTGCGCCACCACAACATGCACCAGCGGAACATGACC
AAGCTGCAGCTCGCCCTGTGA

FIG. 10 A

GCG CCC CCG GGC GCT TCG GCT TAC GGG TCG TTG GGC GGC CCC
GCG CCG CCA CCG GCT CCG CCG CCA CCC CCG CCG CCG CCG CCT

FIG. 10 B

GCC CCC CCC GGC GCC AGC GCG TAC GGG TCC CTG GGC GGC CCG
Ala Pro Pro Gly Ala Ser Ala Tyr Gly Ser Leu Gly Gly Pro
GCC CCG CCC CCC GCC CCG CCC CCC CCG CCG CCC CCC CCG CCG
Ala Pro Pro Pro Ala Pro Pro Pro Pro Pro Pro Pro Pro Pro

FIG. 10 C

GCT CCT CCA GGA GCT AGC GCT TAC GGA TCT CTG GGA GGA CCT
Ala Pro Pro Gly Ala Ser Ala Tyr Gly Ser Leu Gly Gly Pro
GCT CCT CCA CCC GCT CCG CCA CCT CCT CCA CCA CCT CCA CCT
Ala Pro Pro Pro Ala Pro Pro Pro Pro Pro Pro Pro Pro Pro

FIG. 10 D

ES 2 668 926 T3

ATGCAGGACCCCGCCAGCACCTGCGTGCCGGAGCCCGCCTCCCAGCACACCCTCCGGAGCGGCCCCGGGTGCC
TGCAGCAGCCCGAGCAGCAGGGCGTCCGCGACCCGGGCGGGATCTGGGCGAAGCTGGGGGCCCGCAGGCCTC
CGCCGAGCGGCTCCAGGGCCCGCGGAGCCGCGGCGCGTCCGGGAGCGAGCCCAGCAGATGGGCTCCGACGTG
CGGGACCTGAACGCCCTGCTCCCCGCCGTGCCAGCCTGGGCGGCGGGGGCGGGTGCGCCCTGCCGGTCTCCG
GGGCGGCCAGTGGGCCCCGTGCTCGACTTCGCCCCCCCCGGCGCCAGCGCGTACGGGTCCCTGGGCGGCCC
GGCCCCGCCCGCCCGCCCGCCCGCCCGCCCGCCCGCCCGCCCGCCCGCACAGCTTCATCAAGCAGGAGCCCTCCTGG
GGCGGCGCCGAGCCCCACGAGGAGCAGTGCCTGAGCGCCTTCACGGTGCACCTTCTCCGGGCAGTTACCCGGGA
CCGCGGGGGCCTGCCGCTACGGCCCCCTTCGGCCCCCCCCCCCCGAGCCAGGCCTCCAGCGGGCAGGCCCGGAT
GTTCCCCAACGCCCCCTACCTCCCTCCTGCCTGGAGAGCCAGCCGGCGATCCGCAACCAGGGCTACAGCACC
GTCACGTTTCGACGGGACCCCTCCTACGGCCACACCCCAAGCCACCACGCCGCCAGTTCCCCAACCACTCCT
TCAAGCACGAGGACCCGATGGGGCAGCAGGGCAGCCTGGGCGAGCAGCAGTACTCCGTGCCCGCCCGCGTGT
CGGGTGCCACACCCCGACGGACAGCTGCACCGGCTCCAGGCCCTCCTGCTGCGGACCCCTACAGCTCCGAC
AACCTCTACCAGATGACCAGCCAGCTGGAGTGCATGACGTGGAACCAGATGAACCTGGGGGCCACCCCTCAAGG
GCGTCGCGGCCGGGTCCAGCTCCAGCGTGAAGTGGACCGAGGGCCAGTCCAACCACAGCACCGGCTACGAGTC
CGACAACCACACGACCCCATCCTGTGCGGGGCCAGTACCGCATCCACACCCACGGCGTGTTCGGGGGATC
CAGGACGTCCGCGGGGTGCCCGGCGTGGCCCCGACCCTGGTCCGCGAGCGCGTCCGAGACGAGCGAGAAGCGGC
CCTTCATGTGCGCCTACCCCGGCTGCAACAAGCGCTACTTCAAGCTCAGCCACCTGCAGATGCACTCCCGGAA
GCACACCGGGGAGAAGCCCTACCAGTGCGACTTCAAGGACTGCGAGCGCCGGTTCCAGCCGCTCCGACCAGCTG
AAGCGGCACCAGCGGCGCCACACCGGCGTGAAGCCGTTCCAGTGCAGACCTGCCAGCGGAAGTTCAGCCGCT
CCGACCACCTCAAGACGCACACCCGGACCCACACCGGGAAGACGAGCGAGAAGCCCTTCTCCTGCCGCTGGCC
CAGCTGCCAGAGAAGTTCCGCCCGGTCCGACGAGCTGGTGCGCCACCACAACATGCACCAGCGGAACATGACC
AAGCTGCAGCTCGCCCTGTGA

FIG. 11

ATGGAGTCTCCCTCGGCCCTCCCCACAGATGGTGCATCCCCTGGCAGAGGCTCCTGCTCACAGCCTCACTTC
 TAACCTTCTGGAACCCGCCACCCTGCCAAGCTCACTATTGAATCCACGCCGTTCAATGTCGCAGAGGGGAA
 GGAGGTGCTTCTACTTGTCCACAATCTGCCCCAGCATCTTTTTGGCTACAGCTGGTACAAAGGTGAAAGAGTG
 GATGGCAACCGTCAAATTATAGGATATGTAATAGGAACTCAACAAGCTACCCCAGGGCCGCATACAGTGGTC
 GAGAGATAATATACCCCAATGCATCCCTGCTGATCCAGAACATCATCCAGAATGACACAGGATTCTACACCCT
 ACACGTCATAAAGTCAGATCTTGTGAATGAAGAAGCAACTGGCCAGTTCCGGGTATACCCGGAGCTGCCAAG
 CCCTCCATCTCCAGCAACAACCTCAAACCCGTGGAGGACAAGGATGCTGTGGCCTTACCTGTGAACCTGAGA
 CTCAGGACGCAACCTACCTGTGGTGGGTAAACAATCAGAGCCTCCCGGTCAGTCCCAGGCTGCAGCTGTCCAA
 TGGCAACAGGACCCTCACTCTATTCAATGTCACAAGAAATGACACAGCAAGCTACAAATGTGAAACCCAGAAC
 CCAGTGAGTGCCAGGCGCAGTGATTGATCCTGAATGTCCTCTATGGCCCCGATGCCCCACCATTTCCC
 CTCTAAACACATCTTACAGATCAGGGGAAAATCTGAACCTCTCCTGCCACGCAGCCTCTAACCCACCTGCACA
 GTACTCTTGGTTTGTCAATGGGACTTTCCAGCAATCCACCCAAGAGCTCTTTATCCCCAACATCACTGTGAAT
 AATAGTGGATCCTATACGTGCCAAGCCATAACTCAGACACTGGCCTCAATAGGACCACAGTCACGACGATCA
 CAGTCTATGCAGAGCCACCCAAACCCTTCATCACCAGCAACAACCTCCAACCCCGTGGAGGATGAGGATGCTGT
 AGCCTTAACCTGTGAACCTGAGATTGAGAACAACCTACCTGTGGTGGGTAAATAATCAGAGCCTCCCGGTC
 AGTCCCAGGCTGCAGCTGTCCAATGACAACAGGACCCTCACTCTACTCAGTGTACAAGGAATGATGTAGGAC
 CCTATGAGTGTGGAATCCAGAACAATTAAGTGTGACCACAGCGACCCAGTCATCCTGAATGTCCTCTATGG
 CCCAGACGACCCACCATTTCCCCCTCATAACCTATTACCGTCCAGGGGTGAACCTCAGCCTCTCCTGCCAT
 GCAGCCTCTAACCCACCTGCACAGTATTCTTGGCTGATTGATGGGAACATCCAGCAACACACACAAGAGCTCT
 TTATCTCCAACATCACTGAGAAGAACAGCGGACTCTATACCTGCCAGGCCAATAACTCAGCCAGTGGCCACAG
 CAGGACTACAGTCAAGACAATCACAGTCTCTGCGGAGCTGCCAAGCCCTCCATCTCCAGCAACAACCTCCAAA
 CCCGTGGAGGACAAGGATGCTGTGGCCTTACCTGTGAACCTGAGGCTCAGAACAACAACCTACCTGTGGTGGG
 TAAATGGTCAGAGCCTCCAGTCAGTCCCAGGCTGCAGCTGTCCAATGGCAACAGGACCCTCACTCTATTCAA
 TGTCACAAGAAATGACGCAAGAGCCTATGTATGTGGAATCCAGAACTCAGTGAGTGCAAACCCGAGTGACCCA
 GTCACCCTGGATGTCTCTATGGGCCGACACCCCATCATTTCCCCCCAGACTCGTCTTACCTTTCCGGGAG
 CGAACCTCAACCTCTCCTGCCACTCGGCCTTAACCCATCCCCGCAGTATTCTTGGCGTATCAATGGGATACC
 GCAGCAACACACAAGTTCTCTTTATCGCCAAAATCACGCCAAATAATAACGGGACCTATGCCTGTTTTGTC
 TCTAECTGGCTACTGGCCGCAATAATTCCATAGTCAAGAGCATCACAGTCTCTGCATCTGGAACCTCTCCTG
 GTCTCTCAGCTGGGGCCACTGTCGGCATCATGATTGGAGTGTGGTTGGGGTTGCTCTGATATAG

FIG. 12

ATGGAGAGCCCGTCGGCCCCGCCGCACCGGTGGTGCATCCCCTGGCAGCGCCTGCTCCTGACCGCGAGCCTGC
 TGACGTTCTGGAACCCGCCGACCACCGCCAAGCTGACCATCGAGAGCACCCGTTCAACGTGGCCGAGGGCAA
 GGAGGTCCTGCTCCTGGTGCACAACCTGCCCCAGCACCTGTTTCGGGTACAGCTGGTACAAGGGCGAGCGGGTG
 GACGGCAACCGGCAGATCATCGGCTACGTGATCGGCACCCAGCAGGCCACGCCGGGCCCCGGCTACAGCGGGC
 GGGAGATCATCTACCCGAACGCCAGCCTGCTGATCCAGAACATCATCCAGAACGACACCGGCTTCTACACCCT
 CCACGTGATCAAGTCGGACCTGGTGAACGAGGAGGCGACCGGCCAGTTCCGGGTCTACCCGGAGCTGCCGAAG
 CCCAGCATCAGCAGCAACACAGCAAGCCGGTGGAGGACAAGGACGCCGTGGCCTTCACCTGCGAGCCGGAGA
 CCCAGGACGCCACGTACCTGTGGTGGGTGAACAACCAGAGCCTGCCGGTGTGCGCCGCGGCTGCAGCTCAGCAA
 CGGCAACCGCACCCCTGACCCTGTTCAACGTGACCCGGAACGACACCGCCAGCTACAAGTGCGAGACCCAGAAC
 CCGGTGAGCGCCCCGGCGGAGCGACAGCGTGATCCTGAACGTGCTGTACGGCCCCGACGCGCCGACGATCTCGC
 CGCTGAACACCAGCTACCGGAGCGGGGAGAACCCTCAACCTGAGCTGCCACGCCGCCAGCAACCCGCGGCCCA
 GTACAGCTGGTTCGTGAACGGGACCTTCCAGCAGTCGACCCAGGAGCTGTTTCATCCCGAACATCACCGTGAAC
 AACAGCGGCAGCTACACCTGCCAGGCCACAACAGCGACACGGGCCTGAACCGGACCACCGTGACCACCATCA
 CCGTCTACGCCGAGCCCCGAAGCCGTTTCATCACGAGCAACAACAGCAACCCGGTGGAGGACGAGGACGCGGT
 GGCCCTGACCTGCGAGCCGGAGATCCAGAACACCACCTACCTGTGGTGGGTGAACAACCAGTCGCTCCCGGTG
 AGCCCCCGCCTGCAGCTGAGCAACGACAACCGGACCCTGACCCTGCTGAGCGTGACGCGGAACGACGTCGGCC
 CGTACGAGTGCGGCATCCAGAACGAGCTCAGCGTGGACCACAGCGACCCGGTGATCCTGAACGTGCTGTACGG
 CCCGGACGACCCGACCATCTCGCCGAGCTACACCTACTACCGGCCCGGGGTGAACCTGAGCCTGAGCTGCCAC
 GCCGCCAGCAACCCGCCGGCCAGTACAGCTGGCTGATCGACGGCAACATCCAGCAGCACACCCAGGAGCTCT
 TCATCTCGAACATCACCGAGAAGAACAGCGGCCTGTACACCTGCCAGGCCAACAACAGCGCGAGCGGCCACAG
 CCGGACGACCGTGAAGACCATCACCGTCAGCGCCGAGCTGCCGAAGCCGTCGATCAGCAGCAACAACAGCAAG
 CCGGTGGAGGACAAGGACGCCGTGGCCTTCACCTGCGAGCCCGAGGCCCAGAACACCACGTACCTGTGGTGGG
 TGACGGCCAGAGCCTGCCGTTGAGCCCGCGCTGCAGCTCTCGAACGGCAACCGCACCCCTGACCCTGTTCAA
 CGTGACCCGGAACGACGCCCGGGCGTACGTCTGCGGGATCCAGAACAGCGTGAGCGCCAACCCGGAGCGACCCG
 GTGACCCTGGACGTGCTGTACGGCCCGGACACCCCGATCATCAGCCCCCGGACAGCTCGTACCTGAGCGGCG
 CCAACCTCAACCTGAGCTGCCACAGCGCCAGCAACCCGAGCCCGCAGTACTCGTGGCGGATCAACGGCATCCC
 GCAGCAGCACACGCAGGTGCTGTTTCATCGCCAAGATCACCCCGAACAAACAACGGCACCTACGCCTGCTTTCGTG
 AGCAACCTGGCGACCCGGCCGGAACAACAGCATCGTCAAGAGCATCACCGTGAGCGCCAGCGGGACCTCGCCCCG
 GCCTGAGCGCCGGCGCCACGGTGGGCATCATGATCGGCGTGTGGTGGGCGTGGCCCTCATCTGA

FIG. 13

ATGCCTCTTGAGCAGAGGAGTCAGCACTGCAAGCCTGAAGAAGGCCTTGAGGCCCGAGGAGAGGCCCTGGGCC
 TGGTGGGTGCGCAGGCTCCTGCTACTGAGGAGCAGCAGACCGCTTCTTCTCTTCTACTCTAGTGGAAGTTAC
 CCTGGGGGAGGTGCCTGCTGCCGACTCACCAGTCTCCTCCCCACAGTCTCAGGGAGCCTCCAGCTTCTCGACT
 ACCATCAACTACACTCTTTGGAGACAATCCGATGAGGGCTCCAGCAACCAAGAAGAGGAGGGGCCAAGAATGT
 TTCCCACCTGGAGTCCGAGTTCCAAGCAGCAATCAGTAGGAAGATGGTTGAGTTGGTTTCAATTTTCTGCTCCT
 CAAGTATCGAGCCAGGGAGCCGGTCACAAAGGCAGAAATGCTGGAGAGTGTCTCAGAAATTGCCAGGACTTC
 TTTCCCGTGATCTTCAGCAAAGCCTCCGAGTACTTGCAGCTGGTCTTTGGCATCGAGGTGGTGGAAAGTGGTCC
 CCATCAGCCACTTGTACATCCTTGTACCTGCCTGGGCCTCTCCTACGATGGCCTGCTGGGCGACAATCAGGT
 CATGCCAAGACAGGCCCTCCTGATAATCGTCCTGGCCATAATCGCAATAGAGGGCGACTGTGCCCTGAGGAG
 AAAATCTGGGAGGAGCTGAGTATGTTGGAGGTGTTTGGAGGGGAGGGAGGACAGTGTCTTCGCACATCCCAGGA
 AGCTGCTCATGCAAGATCTGGTGCAGGAAAACCTGGAGTACCGGCAGGTGCCCGGAGTATCCTGCATG
 CTACGAGTTCTGTGGGGTCCAAGGGCCCTCATTGAAACCAGCTATGTGAAAGTCTGCACCATACTAAAG
 ATCGGTGGAGAACCTCACATTTCTACCCACCCCTGCATGAACGGGCTTTGAGAGAGGGGAGAAGAGTGA

FIG. 14

ATGCCCCTGGAGCAGCGGAGCCAGCACTGCAAGCCGGAGGAGGGCCTCGAGGCCCGGGGGAGGCCCTGGGCC
 TGGTGGGGGCGCAGGCCCCCGCCACCGAGGAGCAGCAGACCGCCTCCAGCTCCAGCACGCTCGTCGAGGTGAC
 CCTGGGCGAGGTGCCCCGCCGCGGACTCCCCAGCCCGCCCCACTCCCCCAGGGGGCCAGCTCCTTCAGCAC
 ACCATCAACTACACGCTGTGGCGGCAGTCCGACGAGGGCAGCTCCAACCAGGAGGAGGAGGGCCCCGCATGT
 TCCCGGACCTCGAGAGCGAGTTCCAGGCCGCCATCTCCCGGAAGATGGTTCGAGCTGGTGCACCTCCTGCTCCT
 GAAGTACCGCGCGCGGGAGCCCGTGACCAAGGCCGAGATGCTGGAGAGCGTCTCCGCAACTGCCAGGACTTC
 TTCCCCTGATCTTCTCCAAGGCCAGCGAGTACCTGCAGCTGGTGTTCGGGATCGAGGTCTGTGGAGGTGGTCC
 CCATCTCCCACCTCTACATCCTGGTGACCTGCCTGGGCCTCAGCTACGACGGGCTGCTGGGCGACAACCAGGT
 GATGCCGAAGACCGGGCTCCTGATCATCGTCCTGGCCATCATCGCCATCGAGGGCGACTGCGCGCCCCGAGGAG
 AAGATCTGGGAGGAGCTCAGCATGCTGGAGGTGTTTCGAGGGCCGGGAGGACTCCGTGTTCCGCCACCCCCGCA
 AGCTGCTCATGCAGGACCTGGTCCAGGAGAACTACCTGGAGTACCGGCAGGTGCCCGGAGCGACCCGGCCTG
 CTACGAGTTCTCTGGGGCCCCCGCGCCCTGATCGAGACGTCTACGTGAAGGTCTGCACCACACCTCAAG
 ATCGGGGGCGAGCCCCACATCAGCTACCCCGCCTGCACGAGCGGGCCCTGCGCGAGGGCGAGGAGTGA

FIG. 15

atgcctcttgagcagaggagtgcactgcaagcctgaagaaggccttgaggcccaggagaggccctgggccc
 tgggtgggtgcgagggctcctgctactgaggagcaggaggctgcctcctcctcttactctagttgaagtcac
 cctgggggaggtgctgctgcccagtcaccagatcctccccagagtcctcagggagcctccagcctccccact
 accatgaactaccctctctggagccaatcctatgaggactccagcaaccaagaagaggaggggccaagcacct
 tcctgacctggagtcaggtccaagcagcactcagtaggaaggtggccgagttggttcattttctgctcct
 caagtatcgagccaggagccggtcaciaaaggcagaaatgctggggagtgctcgtcggaaattggcagtatctc
 tttcctgtgatcttcagcaaagcttcagttccttgccagctgggtctttggcatcgagctgatggaagtggacc
 ccatcggccacttgtagatctttgccacctgcctgggcccctcctacgatggcctgctgggtgacaatcagat
 catgcccaaggcaggcctcctgataatcgtcctggccataatcgcaagagagggcgactgtgcccctgaggag
 aaaatctgggaggagctgagtggttagaggtgtttgaggggaggggaagacagtatcttgggggatcccaga
 agctgctcacccaacatttcgtgcagggaaaactacctggagtaccggcaggtccccggcagtgatcctgcatg
 ttatgaattcctgtggggccaagggccctcgttgaaaccagctatgtgaaagtcctgcaccatatggtaaag
 atcagtgaggacctcacatttctaccaccctgcatgagtggtttttgagagaggggggaagagtgga

FIG. 16

ATGCCCTGGAGCAGCGCTCGCAGCACTGCAAGCCGGAGGAGGGCCCTCGAGGCCCGGGGCGAGGCCCTGGGCC
TGGTGGGCGCGCAGGCCCGGCCACCGAGGAGCAGGAGGCCGCCAGCAGCAGCAGCACCCCTGGTGGAGGTGAC
CCTGGGCAGGTGCCGGCCGCGGAGAGCCCGGACCCGCCAGTCGCCGCAGGGGGCCAGCAGCCTGCCGACC
ACGATGAAC TACCCGCTCTGGAGCCAGAGCTACGAGGACAGCTCGAACCAGGAGGAGGAGGGCCCGAGCACCT
TCCCGGACCTGGAGAGCGAGTTCAGGCCGCCCTGAGCCGGAAGGTGGCCGAGCTGGTCCACTTCCTGCTGCT
CAAGTACCGGGCCCGGAGCCCGTGACCAAGGCCGAGATGCTGGGCAGCGTGGTGGGCAACTGGCAGTACTTC
TTCCCGGTGATCTTCAGCAAGGCCTCGAGCAGCCTGCAGCTGGTGTTCGGCATCGAGCTGATGGAGGTGCGACC
CGATCGGCCACCTGTACATCTTCGCCACCTGCCTCGGGCTGAGCTACGACGGCCTGCTGGGCGACAACCAGAT
CATGCCGAAGGCCGGCCTGCTGATCATCGTGCTCGCCATCATCGCCCGGAGGGCGACTGCGCGCCGGAGGAG
AAGATCTGGGAGGAGCTGAGCGTGCTGGAGGTGTTTCGAGGGCCGCGAGGACAGCATCCTGGGGACCCGAAGA
AGCTGCTGACCCAGCACTTCGTGCAGGAGAACTACCTCGAGTACCGGCAGGTGCCCGGCTCGGACCCGGCCTG
CTACGAGTTCCTGTGGGGCCCGCGGGCCCTGGTTCGAGACCAGCTACGTGAAGGTGCTGCACCACATGGTGAAG
ATCAGCGGCGGCCCGCACATCAGCTACCCGCCGCTGCACGAGTGGGTGCTGCGGGAGGGCGAGGAGTGA

FIG. 17

ATGGGTGCCCCGACGTTGCCCCCTGCCTGGCAGCCCTTTCTCAAGGACCACCGCATCTCTACATTCAAGAACT
GGCCCTTCTTGGAGGGCTGCGCCTGCACCCCGGAGCGGATGGCCGAGGCTGGCTTCATCCACTGCCCCACTGA
GAACGAGCCAGACTTGGCCAGTGTCTTCTGCTTCAAGGAGCTGGAAGGCTGGGAGCCAGATGACGACCCC
ATAGAGGAACATAAAAAGCATTTCGTCCGGTTGCGCTTTCTTTCTGTCAAGAAGCAGTTTGAAGAATTAACCC
TTGGTGAATTTTTGAAACTGGACAGAGAAAGAGCCAAGAACAAAATTGCAAAGGAAACCAACAATAAGAAGAA
AGAATTTGAGGAACTGCGAAGAAAGTGCGCCGTGCCATCGAGCAGCTGGCTGCCATGGATTGA

FIG. 18

ATGGGCGCCCCACCCCTGCCGCCGGCCTGGCAGCCGTTTCTCAAGGACCACCGCATCTCGACCTTCAAGAACTG
GCCGTTCCCTGGAGGGCTGCGCGTGCACCCCGGAGCGGATGGCCGAGGCGGGCTTCATCCACTGCCCCACCGAGA
ACGAGCCGGACCTGGCCAGTGTCTTCTGCTTCAAGGAGCTGGAGGGCTGGGAGCCGGACGACGACCCGATC
GAGGAGCACAAGAAGCACAGCAGCGGCTGCGCCTTCTGAGCGTGAAGAAGCAGTTTCGAGGAGCTGACGCTCGG
GGAGTTCCCTGAAGCTGGACCGGGAGCGGGCCAAGAACAAGATCGCGAAGGAGACCAACAACAAGAAGAAGGAGT
TCGAGGAGACCGCCAAGAAGGTGCGGCGGGCCATCGAGCAGCTGGCCGCCATGGACTGA

FIG. 19

ATGCAGGCCGAAGGCCGGGGCACAGGGGTTTCGACGGGCGATGCTGATGGCCCAGGAGGCCCTGGCATTCCCTG
ATGGCCCAGGGGGCAATGCTGGCGGCCAGGAGAGGCGGGTGCACGGGCGGCAGAGGTCCCCGGGGCGCAGG
GGCAGCAAGGGCCTCGGGGCGGGAGGAGGCGCCCCGCGGGTCCGCATGGCGGCGCGGCTTCAGGGCTGAAT
GGATGCTGCAGATGCGGGGCCAGGGGGCCGGAGAGCCGCCTGCTTGAGTTCTACCTCGCCATGCCTTTTCGCGA
CACCCATGGAAGCAGAGCTGGCCCGCAGGAGCCTGGCCCAGGATGCCCCACCGCTTCCCGTGCAGGGGTGCT
TCTGAAGGAGTTCACTGTGTCCGGCAACATACTGACTATCCGACTGACTGCTGCAGACCACCGCCAACCTGCAG
CTCTCCATCAGCTCCTGTCTCCAGCAGCTTTCCCTGTTGATGTGGATCACGCAGTGCTTTCTGCCCGTGTCTTT
TGGCTCAGCCTCCCTCAGGGCAGAGGCGCTAA

FIG. 20

ATGCAGGCCGAGGGCCGGCACCGGCGGCTCGACCGGCGACGCCGACGGGCCCGGCGGCCCGGGCATCCCGG
ACGGCCCCGGGCGGGAACGCGGGCGGCCCGGGCGAGGCCGGCGCCACCGGCGGGCGGGGCCCGGGGCGCCGG
CGCCGCCCGGGCGAGCGGCCCGGGCGGGGGCGCCCCGCGGGGCCCGCACGGCGGGCGCCAGCGGCCTGAAC
GGGTGCTGCCGGTGCGGCGCCCGCGGCCCGGAGAGCCGGCTCCTGGAGTTCTACCTGGCCATGCCGTTTCGCGA
CCCCGATGGAGGCCGAGCTGGCCCGGCGGAGCCTGGCCCAGGACGCCCCGCGCTGCCCGTGCCGGCGTGCT
CCTGAAGGAGTTCACGGTGAGCGGCAACATCCTGACCATCCGGCTGACCGCCGCGGACCACCGGCAGCTGCAG
CTGTCGATCAGCAGCTGCCTCCAGCAGCTGAGCCTGCTGATGTGGATCACCCAGTGCTTCCTGCCGGTGTTC
TGGCCAGCCGCCAGCGGCCAGCGCCGGTGA

FIG. 21

ATGGGGGACAAGGATATGCCTACTGCTGGGATGCCGAGTCTTCTCCAGAGTTCCCTCTGAGAGTCCCTCAGAGTT
 GTCCTGAGGGGGAGGACTCCCAGTCTCCTCTCCAGATTCCCCAGAGTTCTCCTGAGAGCGACGACACCCTGTA
 TCCTCTCCAGAGTCCCTCAGAGTCGTTCTGAGGGGGAGGACTCCTCGGATCCTCTCCAGAGACCTCCTGAGGGG
 AAGGACTCCCAGTCTCCTCTCCAGATTCCCCAGAGTTCTCCTGAGGGGCGACGACACCCAGTCTCCTCTCCAGA
 ATTCTCAGAGTTCTCCTGAGGGGAAGGACTCCCTGTCTCCTCTAGAGATTTCTCAGAGCCCTCCTGAGGGTGA
 GGATGTCCAGTCTCCTCTGCAGAATCCTGCGAGTTCCTTCTTCTCCTCTGCTTTATTGAGTATTTTCCAGAGT
 TCCCCTGAGAGTACTCAAAGTCCTTTTGAGGGTTTTCCCCAGTCTGTTCTCCAGATTCTGTGAGCGCCGCT
 CCTCCTCCACTTTAGTGAGTATTTTCCAGAGTCCCCTGAGAGTACTCAAAGTCCTTTTGAGGGTTTTCCCCA
 GTCTCCACTCCAGATTCCCTGTGAGCCGCTCCTTCTCCTCCACTTTATTGAGTATTTTCCAGAGTCCCCTGAG
 AGAAGTCCAGAGTACTTTTTGAGGGTTTTGCCCAGTCTCCTCTCCAGATTCCCTGTGAGCCCTCCTCCTCCTCCA
 CTTTACTGAGTCTTTTCCAGAGTTTCTCTGAGAGAAGTCCAGAGTACTTTTTGAGGGTTTTGCCCAGTCTTCTCT
 CCAGATTCCCTGTGAGCCCTCCTTCTCCTCCACTTTAGTGAGTCTTTTCCAGAGTCCCCTGAGAGAAGTCCAG
 AGTACTTTTGGGGTTTTCCCCAGTCTCCTCTCCAGATTCCCTGTGAGTCTCCTCCTCCTCCACTTTATTGA
 GTCTTTTCCAGAGTCCCCTGAGAGAAGTCCAGTACTTTTGGGGTTTTCCCCAGTCTTCTCTCCAGATTCC
 TATGACCTCCTCCTTCTCCTTACTTTATTGAGTATTTTCCAGAGTTCTCCTGAGAGTGTCAAAGTACTTTT
 GAGGGTTTTCCCCAGTCTCCTCTCCAGATTCCCTGGGAGCCCTCCTTCTCCTCCACTTTACTGAGTCTTTTCC
 AGAGTTCCCCTGAGAGAAGTCCAGTACTTTTGGGGTTTTCCCCAGTCTCCTCTCCAGATTCCCTATGACCTC
 CTCTTCTCCTTACTTTATTGAGTATTTTACAGAGTTCTCCTGAGAGTGTCAAAGTGTCTTTGAGGGTTTT
 CCCCAGTCTCCTCTCCAGATTCCCTGTGAGTCTCCTTTTCTCCTACTTTATTGAGTCTTTTCCAGAGTTCCC
 CTGAGAGAAGTCCAGTACTTTTGGGGTTTTCCCCAGTCTCCTCTCCAGATTCCCTGTGAGTCTCCTCCTCCTC
 CTCTCCACTTTATTGAGTCTTTTCCAGAGTCCCCTGAGTGTACTCAAAGTACTTTTGGGGTTTTCCCCAG
 TCTCCTCTCCAGATTCCCTCAGAGTCTCCTGAAGGGGAGAATACCCATTCTCCTCTCCAGATTGTTCCAAGTC
 TTCCCTGAGTGGGAGGACTCCCTGTCTCCTCACTACTTTCCCTCAGAGCCCTCCTCAGGGGGAGGACTCCCTATC
 TCCTCACTACTTTCTCAGAGCCCTCCTCAGGGGGAGGACTCCCTGTCTCCTCACTACTTTCTCAGAGCCCT
 CAGGGGGAGGACTCCCTGTCTCCTCACTACTTTCCCTCAGAGCCCTCCTCAGGGGGAGGACTCCATGTCTCCTC
 TCTACTTTCCCTCAGAGTCTCCTCAGGGGGAGGAATCCAGTCTTCTCTCCAGAGCCCTGTGAGCATCTGCTC
 CTCTCCACTCCATCCAGTCTTCCCCAGAGTTTCCCTGAGAGTTCTCAGAGTCCCTGAGGGGCCTGTCCAG
 TCTCCTCTCCATAGTCTCAGAGCCCTCCTGAGGGGATGCACTCCCAATCTCCTCTCCAGAGTCCCTGAGAGTG
 CTCCTGAGGGGGAGGATTCCCTGTCTCCTCTCCAAATTCCTCAGAGTCCCTTTGAGGGGAGGACTCCCTGTC
 TTCTCTCCATTTCCCTCAGAGTCCCTGAGTGGGAGGACTCCCTCTCCTCTCCACTTTCCCTCAGTTTCCCT
 CCTCAGGGGGAGGACTTCCAGTCTTCTCTCCAGAGTCCCTGTGAGTATCTGCTCCTCCTCCACTTCTTTGAGTC
 TCCCCAGAGTTTCCCTGAGAGTCCCTCAGAGTCTCCTGAGGGGCCTGCTCAGTCTCCTCTCCAGAGACCTGT
 CAGCTCCTTCTTCCCTACACTTTAGCGAGTCTTCTCAAAGTTCCCATGAGAGTCCCTCAGAGTCCCTCTGAG
 GGGCTGCCAGTCTCCTCTCCAGAGTCCCTGTGAGTCTTCCCTCCTCCACTTCATCGAGTCTTTCCAAGAGTTCCCCTGAGAGTCCCTCTCCA
 GAGTCCCTGTGATCTCCTTCTCCTCCTCCACTTCATTGAGCCATTCCAGTGAAGAGTCCAGCAGCCAGTAGAT
 GAATATACAAGTTCCTCAGACACCTTGCTAGAGAGTGATTCCCTTGACAGACAGCGAGTCCCTTGATAGAGAGCG
 AGCCCTTGTTCACTTATACACTGGATGAAAAGGTGGACGAGTTGGCGCGGTTTTCTTCTCCTCAAATATCAAGT
 GAAGCAGCCTATCACAAAGGCAGAGATGCTGACGAATGTCATCAGCAGGTACACGGGCTACTTTCTGTGATC
 TTCAGGAAAGCCCGTGAGTTCATAGAGATACTTTTTGGCATTTCCTGAGAGAAGTGGACCCTGATGACTCCT
 ATGTCTTTGTAAACACATTAGACCTCACCTCTGAGGGGTGTCTGAGTGTGAGCAGGGCATGTCCAGAACCG
 CCTCCTGATTCTTATTCTGAGTATCATCTTATAAAGGGCACCTATGCCTCTGAGGAGGTGATCTGGGATGTG
 CTGAGTGAATAGGGGTGCGTGTGGGAGGGAGCACTTTGCCTTTGGGGAGCCAGGGAGTCTCCTCACTAAAG
 TTTGGGTGCAGGAACATTACCTAGAGTACCGGGAGGTGCCAACTCTTCTCCTCCTCGTTACGAATTCTGTG
 GGGTCCAAGAGCTCATTCAGAAGTCATTAAGAGGAAAGTAGTAGAGTTTTTGGCCATGCTAAAGAATACCGTC
 CCTATTACCTTTCCATCCTCTTACAAGGATGCTTTGAAAGATGTGGAAGAGAGAGCCAGGCCATAATTGACA
 CCACAGATGATTGACTGCCACAGAAAGTGCAAGCTCCAGTGTGATGTCCCCAGCTTCTCTTCTGAGTGA

FIG. 22

ATGGGGGACAAAGGACATGCCACCAGCCGGGATGCCGAGCCTGCTCCAGTCCAGCTCCGAGAGCCCCAGTCCCT
 GCCCCGAGGGGCGAGGACAGCCAGTCCCCCTGCAGATCCCGCAGAGCTCCCCGAGAGCGACGACACCCTGTA
 CCCCCCTCCAGTCCCCGAGAGCCGGTCCGAGGGGAGGACAGCTCCGACCCGCTGCAGCGCCCCCCCCGAGGGC
 AAGGACAGCCAGTCCCCGCTGCAGATCCCGCAGAGCTCCCCGAGGGGGACGACACGCAGAGCCCCCTCCAGA
 ACAGCCAGTCCAGCCCCGAGGGCAAGGACTCCCTGAGCCGCTGGAGATCTCCAGAGCCCCCCCCGAGGGCGA
 GGACGTGCAGTCCCCGCTCCAGAACCCGGCCAGCTCCTTCTTCCAGCTCCGCGCTGCTGAGCATCTTCCAGTCC
 AGCCCCGAGTCCACCAGAGCCCCCTTCCGAGGGGTTCCCCAGTCCGTCTCCAGATCCCGGTGAGCGCCGCT
 CCAGCAGCACCCCTGGTGTCCATCTTCCAGAGCTCCCCGAGAGCACCCAGTCCCCCTTCCGAGGGCTTCCCCCA
 GAGCCCGCTGCAGATCCCCGTGTCCCGGAGCTTCTCCAGCACGCTCCTGTCCATCTTCCAGAGCTCCCCGAG
 CGCACCCAGAGCACCTTCCGAGGGGTTCCGCCAGTCCCCGCTGCAGATCCCCGTGAGCCCCCTCCAGCAGCTCCA
 CCTCCTGAGCCTGTTCAGTCCCTTCCAGCGAGCGGACGCAGTCCACCTTCCGAGGGCTTCCGCCAGAGCTCCCT
 CCAGATCCCCGTGAGCCCGTCTTCCAGTCCACCCTGGTCAGCCTGTTCAGTCCAGCCCCGAGCGCACCCAG
 TCCAGTTCGAGGGGTTCCCCAGAGCCCCCTCCAGATCCCGGTGTCCAGTCCAGCAGTCCACCCTGCTGA
 GCCTTCCAGTCCAGCCCCGAGCGGACCCACTCCACCTTCCGAGGGCTTCCCCAGAGCCTGCTGCAGATCCC
 CATGACGTCCAGTCTTCCAGCACCCCTCCTGTCCATCTTCCAGAGCTCCCGGAGAGCGCGCAGTCCACCCTC
 GAGGGCTTCCCCAGAGCCCCCTGCAGATCCCCGGGTCCCCGAGCTTCTCCAGCACCCCTCCTGAGCCTGTTCC
 AGTCCAGCCCCGAGCGCACGCACTCCACCTTCCGAGGGGTTCCCCAGAGCCCCCTCCAGATCCCGATGACCTC
 CAGCTTCTCCAGCACCCCTGCTGTCCATCCTCCAGAGCTCCCCGAGAGCGCCAGTCCCGCTTCCGAGGGGTTCC
 CCCCAGAGCCCCCTGCAGATCCCGGTGTCCAGTCTTCCAGTACACGCTGCTCTCCCTGTTCCAGAGCAGCC
 CCGAGCGGACCCACTCCACCTTCCGAGGGGTTCCCCAGAGCCCGCTGCAGATCCCCGTGTCCAGTCCAGCTC
 CAGTCCACCCTCCTGAGCCTGTTCAGTCCAGCCCCGAGTGCACGCAGTCCACCTTCCGAGGGGTTCCCCAG
 AGCCCGCTGCAGATCCCCAGTCCCCCCCCGAGGGGGAGAACACCCACAGCCCGCTCCAGATCGTGCCCTCCC
 TGCCCGAGTGGGAGGACAGCCTGTCCCGCACTACTTCCCGCAGAGCCCCCGCAGGGCGAGGACAGCCTCTC
 CCCCCTACTTCCCGCAGAGCCCGCCCAGGGGGAGGACTCCCTGAGCCCCACTACTTCCCGCAGTCCCCC
 CAGGGCGAGGACAGCCTGTCCCGCACTACTTCCCGCAGAGCCCGCCCAGGGGGAGGACTCCATGAGCCCCC
 TCTACTTCCCCAGTCCCCGCTGCAGGGCGAGGAGTCCAGAGCTCCCTGCAGAGCCCCGTGTCCATCTGCAG
 CTCCAGCACCCCTCCAGCCTCCCGCAGAGCTTCCCCGAGTCCAGCCAGTCCCCCCCCGAGGGGCCGGTCCAG
 AGCCCCCTGCACTCCCCGCAGAGCCCCCGGAGGGGATGCACTCCAGAGCCCCCTGCAGTCCCCCGAGAGCG
 CCCCCGAGGGGCGAGGACTCCCTCAGCCCGCTGCAGATCCCCCAGTCCCCGCTGGAGGGGGAGGACAGCCTCTC
 CAGCCTGCATTCCCCCAGTCCCCGCCCAGTGGGAGGACAGCCTGAGCCCCCTCCACTTCCCCCAGTTCCCG
 CCCCAGGGCGAGGACTTCCAGTCCAGCCTGCAGTCCCCCGTGCAGATCTGCTCCAGTCCACGAGCCTGTCCC
 TCCCCAGAGCTTCCCGGAGTCCCCCCAGAGCCCGCCGAGGGGCCGGCGCAGTCCCCCTGCAGCGCCCCGT
 GAGCTCCTTCTCAGCTACACCCTGGCCTCCCTCCTGCAGAGCTCCACGAGAGCCCGCAGAGCCCCCGGAG
 GGCCCCGCCCAGTCCCCGCTGCAGAGCCCCGTGTCCAGTTCCTCCAGCACCTCCAGTCCCTCAGCCAGT
 CCAGCCCCGTGTCCAGCTTCCCGTCCAGCACCTCCAGTCCCTGAGCAAGAGCTCCCCCGAGAGCCCCCTGCA
 GTCCCCCGTGATCAGCTTCTCCAGTCCACGAGCCTTCCCCGTTCCAGCGAGGAGTCCAGTCCCCCGTCCGAC
 GAGTACACCAGTCCAGCGACACCCTGCTGGAGTCCGACAGCCTCACCAGTCCGAGAGCCTGATCCGAGAGCG
 AGCCCCGTGTTACCTACAGCTCGACGAGAAGGTGGACGAGCTGGCCCGGTTCCCTGCTCCTGAAGTACCAGGT
 GAAGCAGCCCATCACCAAGGCCGAGATGCTGACCAACGTCACTTCCCGCTACACCCGGTACTTCCCGGTGATC
 TTCCGGAAGGCGCGGAGTTTATCGAGATCCTTTCGGGATCAGCCTGCGGGAGGTGGACCCCCGACGACTCCT
 ACGTCTTCTGTAACAGCTGGACCTCACCAGCGAGGGCTGCCTGTCCGACGAGCAGGGGATGAGCCAGAACCG
 CCTGCTCATCTGATCCTGTCCATCATCTTCCATCAAGGGCACCTACGCCAGCGAGGAGGTTCATCTGGGACGTG
 CTCTCCGGGATCCGGCTGCGGGCCGGCCGCGAGCACTTCCGCTTCCGGGAGCCCCGGGAGCTGCTGACCAAGG
 TCTGGGTGCAGGAGCACTACCTCGAGTACCCGAGGGTGCCAACAGCTCCCCGCCCGGTACGAGTTCTGTG
 GGGCCCCCGCGCCACAGCGAGGTTCATCAAGCGGAAGGTGGTGGAGTTTCTGGCGATGCTCAAGAACACGGTC
 CCCATCACCTTCCCGTCCAGCTACAAGGACGCCCTGAAGGACGTGGAGGAGCGGGCCAGGCCATCATCGACA
 CCACCGAGCACTCCACGGCCACCGAGAGCGCGTCCAGTCCCGTGTGAGCCCCAGCTTCTCCAGCGAGTGA

FIG. 23

ATGCAGTCCCCGCTGCAGGGCGAGGAGTTCCAGAGCTCCCTGCAGAGCCCCGTGTCCATCTGCAGCTCCAGCA
 CCCCCCTCCAGCCTCCCGCAGAGCTTCCCCGAGTCCAGCCAGTCCCCCCCCGAGGGCCCGGTCCAGAGCCCCCT
 GCACTCCCCCGCAGAGCCCCCGGAGGGGATGCACTCCCAGAGCCCCCTGCAGTCCCCCGAGAGCGCCCCGAG
 GCGGAGGACTCCCTCAGCCCGCTGCAGATCCCCCAGTCCCCGCTGGAGGGGGAGGACAGCCTCTCCAGCCTGC
 ACTTCCCCCAGTCCCCGCCCCGAGTGGGAGGACAGCCTGAGCCCCCTCCACTTCCCCCAGTTCCCGCCCCAGGG
 CGAGGACTTCCAGTCCAGCCTGCAGTCCCCCGTGCAGTCTGCTCCAGCTCCACGAGCCTGTCCCTCCCCAG
 AGCTTCCCGGAGTCCCCCAGAGCCCCGCCCCGAGGGGCCGGCGCAGTCCCCCCTGCAGCGCCCCGTGAGCTCCT
 TCTTCCAGCTACACCCTGGCCTCCCTCCTGCAGAGCTCCCACGAGAGCCCCGAGAGCCCCGCCCCGAGGGCCCCGC
 CCAGTCCCCGCTGCAGAGCCCCGTGTCCAGCTTCCCCTCCAGCACCTCCAGCTCCCTCAGCCAGTCCAGCCCC
 GTGTCCAGCTTCCCGTCCAGCACCTCCAGCTCCCTGAGCAAGAGCTCCCCCGAGAGCCCCCTGCAGTCCCCCG
 TGATCAGCTTCTCCAGCTCCACGAGCCTTCCCCGTTCCAGCGAGGAGTCCAGCTCCCCCGTCCGACGAGTACAC
 CAGCTCCAGCGACACCCTGCTGGAGTCCGACAGCCTCACCAGTCCGAGAGCCTGATCGAGAGCGAGCCCCCTG
 TTCACCTACACGCTCGACGAGAAGGTGGACGAGCTGGCCCGGTTCTGCTCCTGAAGTACCAGGTGAAGCAGC
 CCATCACC AAGGCCGAGATGCTGACCAACGTCACTTCCCGCTACACCGGCTACTTCCCGGTGATCTTCCGGAA
 GGCGCGGAGTTCATCGAGATCCTCTTCCGGATCAGCCTGCGGGAGGTGGACCCCCGACGACTCCTACGTCTTC
 GTGAACACGCTGGACCTCACCAGCGAGGGCTGCCTGTCCGACGAGCAGGGGATGAGCCAGAACCGCCTGCTCA
 TCCTGATCCTGTCCATCATCTTCATCAAGGGCACCTACGCCAGCGAGGAGGTCATCTGGGACGTGCTCTCCGG
 GATCGGGCTGCGGGCCGGCCGCGAGCACTTCGCCTTCCGGGAGCCCCGGGAGCTGCTGACCAAGGTCTGGGTG
 CAGGAGCACTACCTCGAGTACCGCGAGGTGCCAACAGCTCCCCGCCCGGTACGAGTTCTGTGGGGCCCCC
 GCGCCACAGCGAGGTCATCAAGCGGAAGGTGGTGGAGTTCTTGGCGATGCTCAAGAACACGGTCCCCATCAC
 CTTCCCGTCCAGCTACAAGGACGCCCTGAAGGACGTGGAGGAGCGGGCCCCAGGCCATCATCGACACCACCGAC
 GACTCCACGGCCACCAGAGCGCGTCCAGCTCCGTGATGAGCCCCAGCTTCTCCAGCGAGTGA

FIG. 24

ATGCCTCCC GTTCCAGGCGTTCATTCCGCAACGTTGACAACGACTCCCCGACCTCAGTTGAGTTAGAAGACT
GGGTAGATGCACAGCATCCCACAGATGAGGAAGAGGAGGAAGCCTCCTCCGCTCTTCCACTTTGTAAGT
ATTTTCCCCCTCTTCTTTCTCCACATCCTCTTCTGATTCTTGGTGGTCTGAGGAGGAGGAGGTGCCCTCT
GGTGTGATACCAAATCTTACCAGAGCATTCCCAGTAGTCTCCACAGGGTCTCCACAGGGTCTTCCCAGA
GTCTCTGAGCTCCTGCTGCTCCTCTTTTTTCATGGAGCTCATTAGTGGAGTCCAGCAGCCAGAAAGGGGA
GGATACAGGCACCTGTCAGGGCCTGCCAGACAGTGTGCTCTTTTACATATACACTAGATGAAAAGGTGGCC
GAGTTAGTGGAGTTCCTGCTCCTCAAATACGAAGCAGAGGAGCCTGTAACAGAGGCAGAGATGCTGATGATTG
TCATCAAGTACAAAGATTACTTTCTGTGATACTCAAGAGAGCCCCGTGAGTTCATGGAGCTTCTTTTTGGCCT
TGCCCTGATAGAAGTGGGCCCTGACCATTCTGTGTGTTTGCAAACACAGTAGGCCTCACCGATGAGGGTAGT
GATGATGAGGGCATGCCCCGAGAACAGCCTCCTGATTATTATTCTGAGTGTGATCTTCATAAAGGGCAACTGTG
CCTCTGAGGAGGTCTCTGGGAAGTGTGAATGCAGTAGGGGTATATGCTGGGAGGGAGCACTTCGTCTATGG
GGAGCCTAGGGAGCTCCTCACTAAAGTTTGGGTGCAGGGACATTACCTGGAGTATCGGGAGGTGCCCCACAGT
TCTCTCCATATTATGAATTCCTGTGGGTCCAAGAGCCATTACAGAAAGCATCAAGAAGAAAGTACTAGAGT
TTTTAGCCAAGCTGAACAACACTGTTCCCTAGTTCCTTTCCATCCTGGTACAAGGATGCTTTGAAAGATGTGGA
AGAGAGAGTCCAGGCCACAATTGATACCGCAGATGATGCCACTGTGATGGCCAGTGAAGCCTCAGTGTGATG
TCCAGCAACGTCTCCTTTTCTGAGTGA

FIG. 25

ATGCCCCCGGTGCCCGGCGTCCCCTTCCGGAACGTTGACAACGACAGCCCCACCTCCGTTGGAGCTGGAGGACT
GGGTGACGCCCAGCACCCGACCGAGGAGGAGGAGGAGGCCAGCTCCGCGAGCTCCACGCTCTACCTGGT
GTTCCAGCCCCTCCAGCTTCTCCACCAGCTCCAGCCTGATCCTCGGGGGCCCCGAGGAGGAGGAGGTGCCCTCC
GGGGTCTATCCCGAACCTGACCGAGAGCATCCCCTCCAGCCCCCGCAGGGCCCGCCCCAGGGGCCCTCCCAGA
GCCCCCTGTCCAGCTGCTGCAGCTCCTTCCAGCTGGTCCAGCTTCTCCGAGGAGAGCTCCAGCCAGAAGGGCGA
GGACACCGGCACGTGCCAGGGGCTCCCGGACTCCGAGAGCTCCTTCCACTACACCCTGGACGAGAAGGTGGCC
GAGCTGGTGGAGTTCCTCCTGCTGAAGTACGAGGCCGAGGAGCCCCGTACCGAGGCCGAGATGCTCATGATCG
TGATCAAGTACAAGGACTACTTCCCCGTGATCCTGAAGCGCGCCCCGGGAGTTCATGGAGCTGCTCTTCGGCCT
GGCGCTGATCGAGGTCCGGGCCGACCATTCTGCGTGTTCGCCAACACGGTGGGCCTCACCGACGAGGGGAGC
GACGACGAGGGCATGCCGGAGAACTCCCTGCTGATCATCATCCTCAGCGTCATCTTCATCAAGGGCAACTGCG
CCTCCGAGGAGGTGATCTGGGAGGTGCTGAACGCCGTCCGGGTGTACGCGGGCCGCGAGCACTTCGTGTACGG
GGAGCCCCGGGAGCTGCTCACCAAGGTCTGGGTGCAGGGCCACTACCTGGAGTACCGCGAGGTGCCGCACAGC
TCCCCCGTACTACGAGTTCCTGTGGGGCCCCCGGGCCACAGCGAGTCCATCAAGAAGAAGGTCTCGAGT
TCCTGGCCAAAGCTGAACAACACCGTGCCCAGCAGCTTCCCCTCCTGGTACAAGGACGCCCTCAAGGACGTCGA
GGAGCGCGTGCAGGCCACGATCGACACCGCGGACGACGCCACCGTGATGGCCAGCGAGTCCCTGAGCGTCATG
TCCAGCAACGTGTCCTTCAGCGAGTGA

FIG. 26

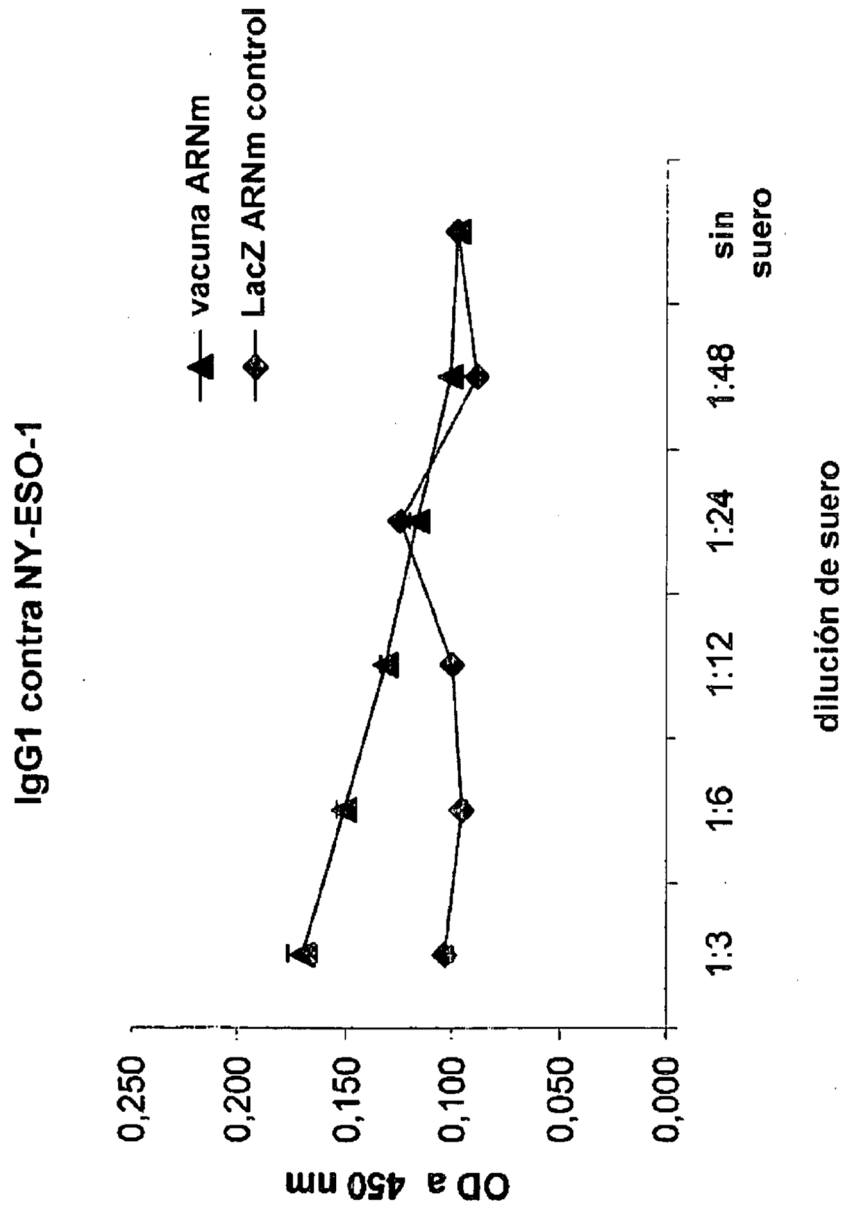


Fig. 27

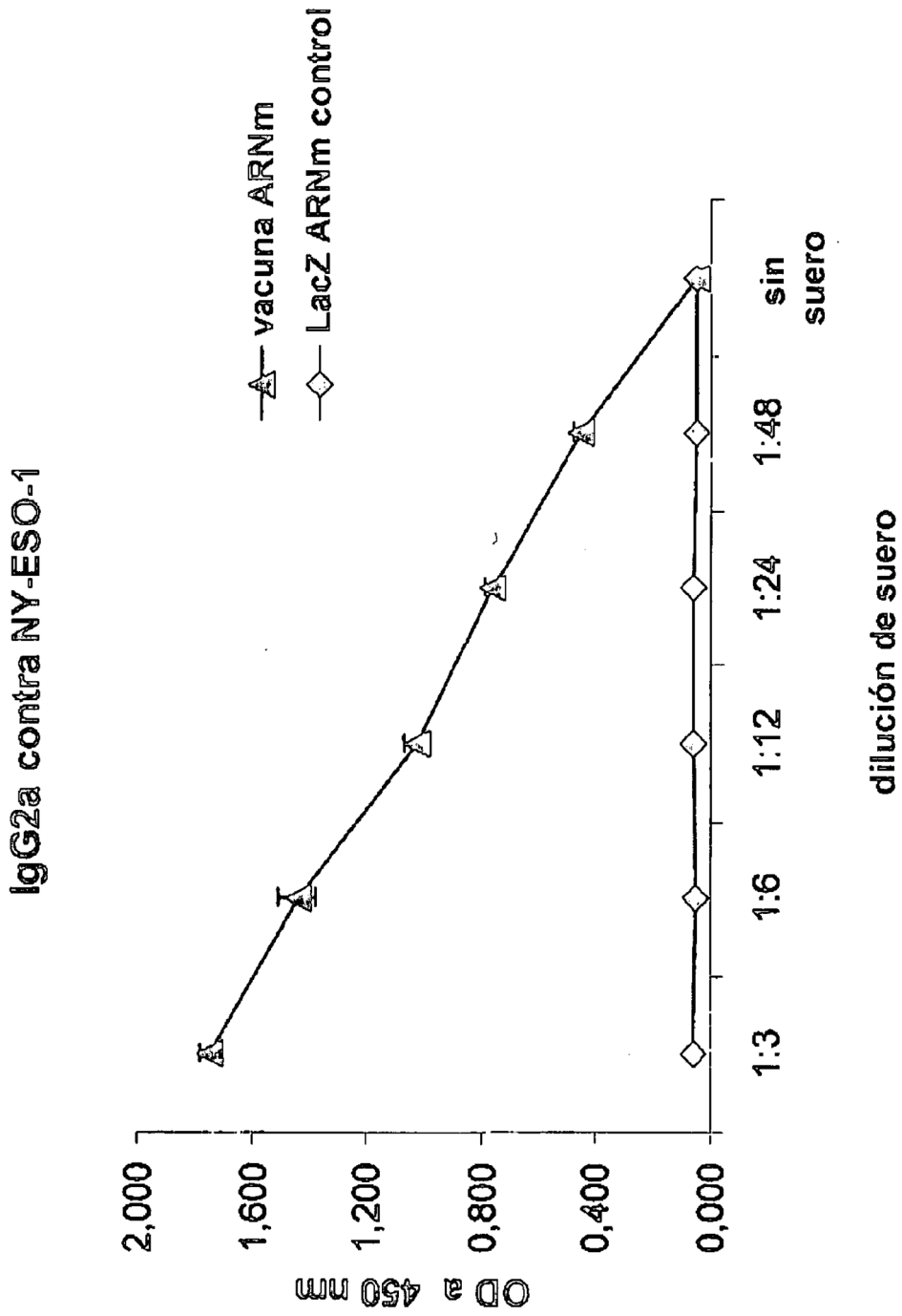


Fig. 28

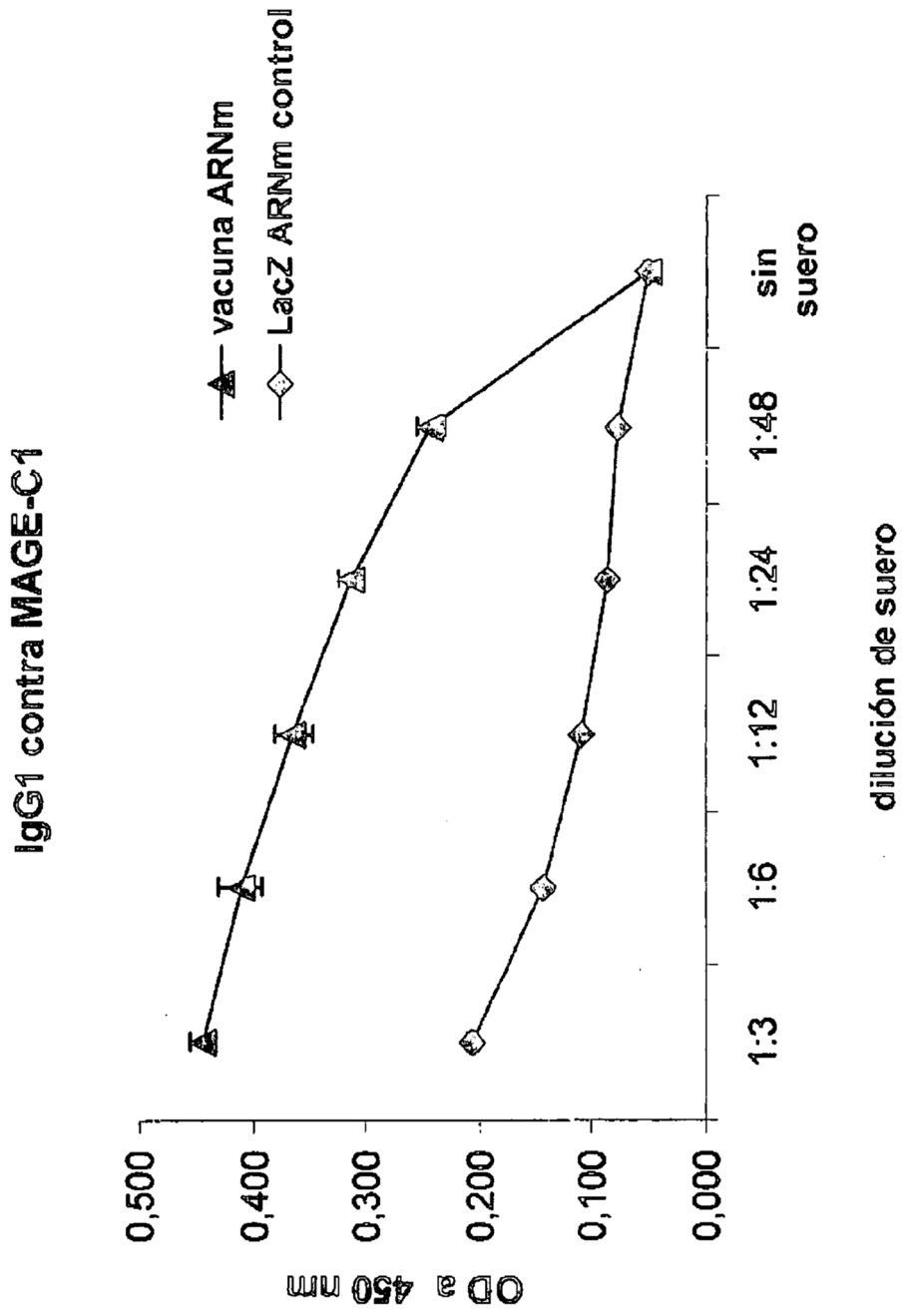


Fig. 29

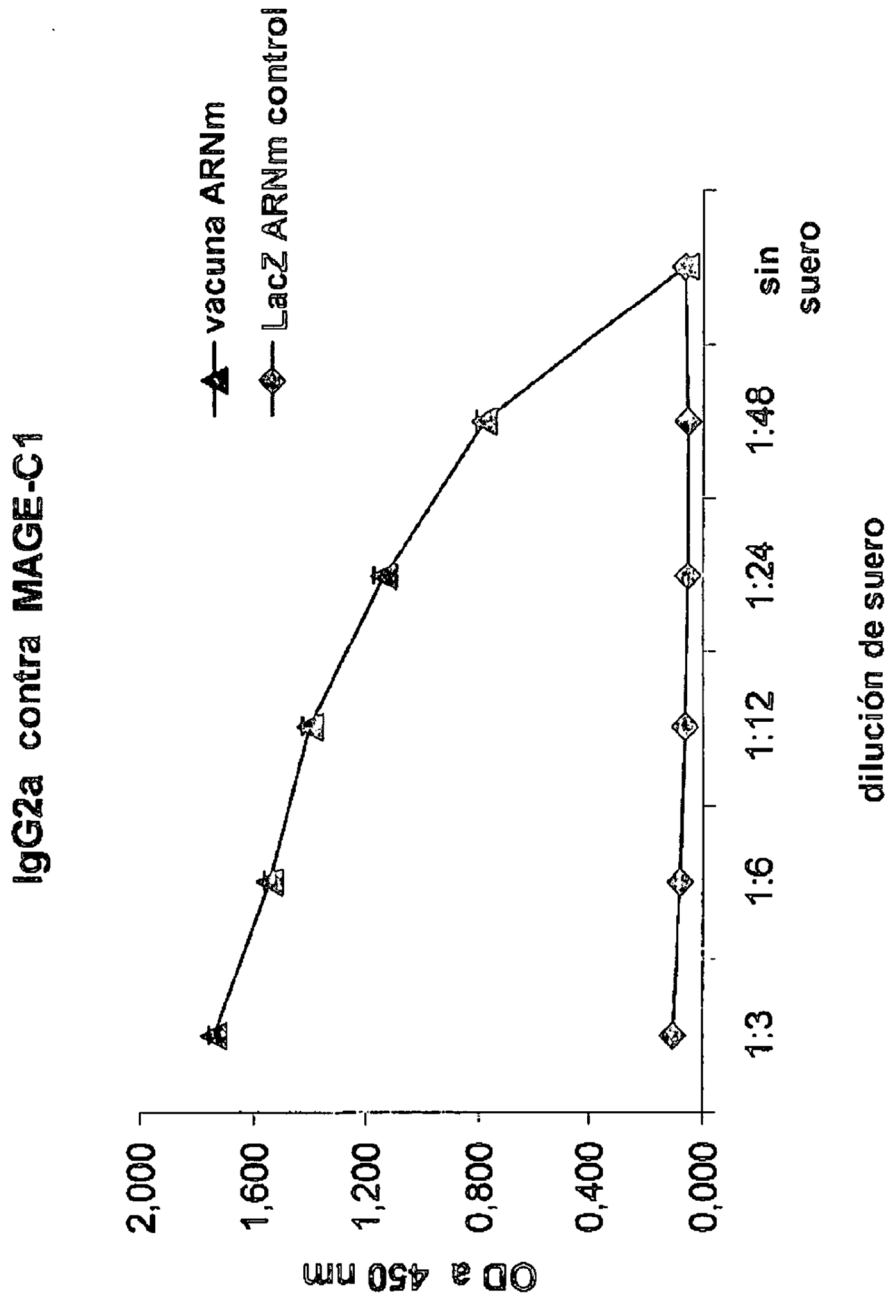


Fig. 30

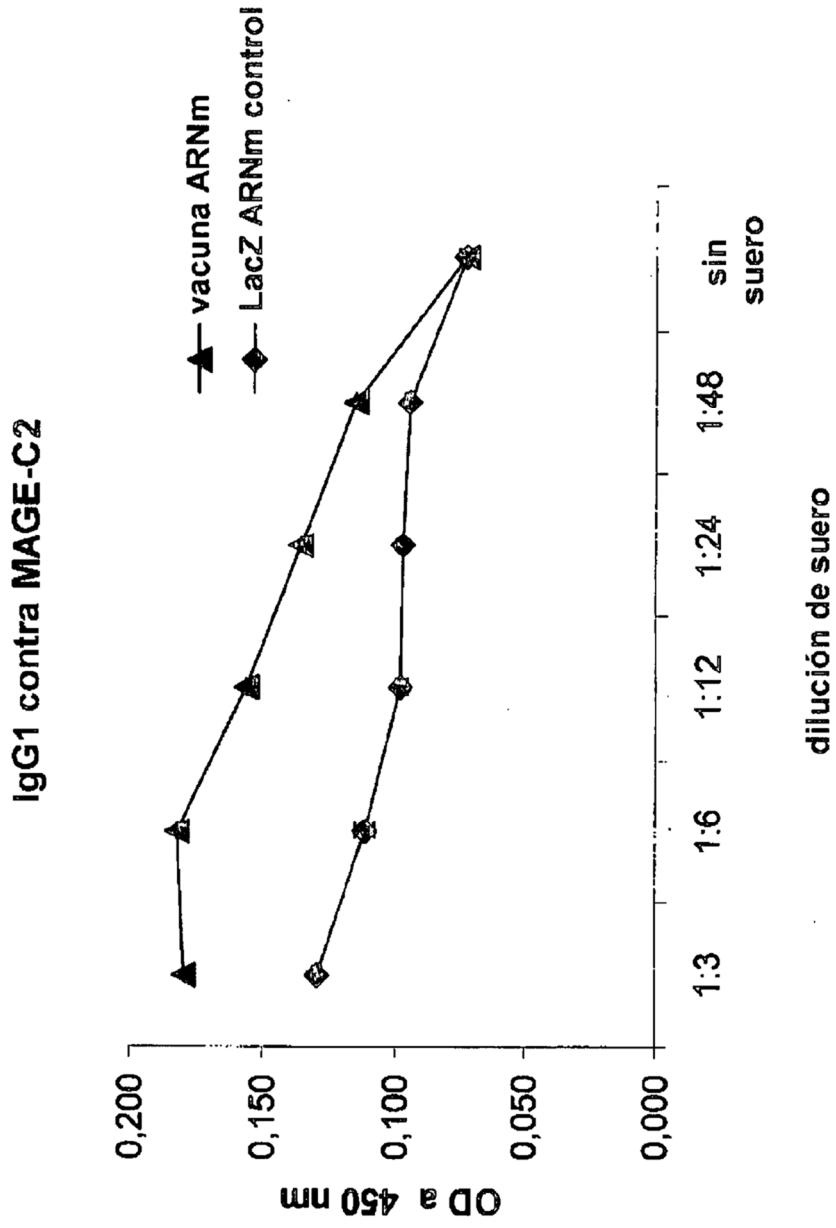


Fig. 31

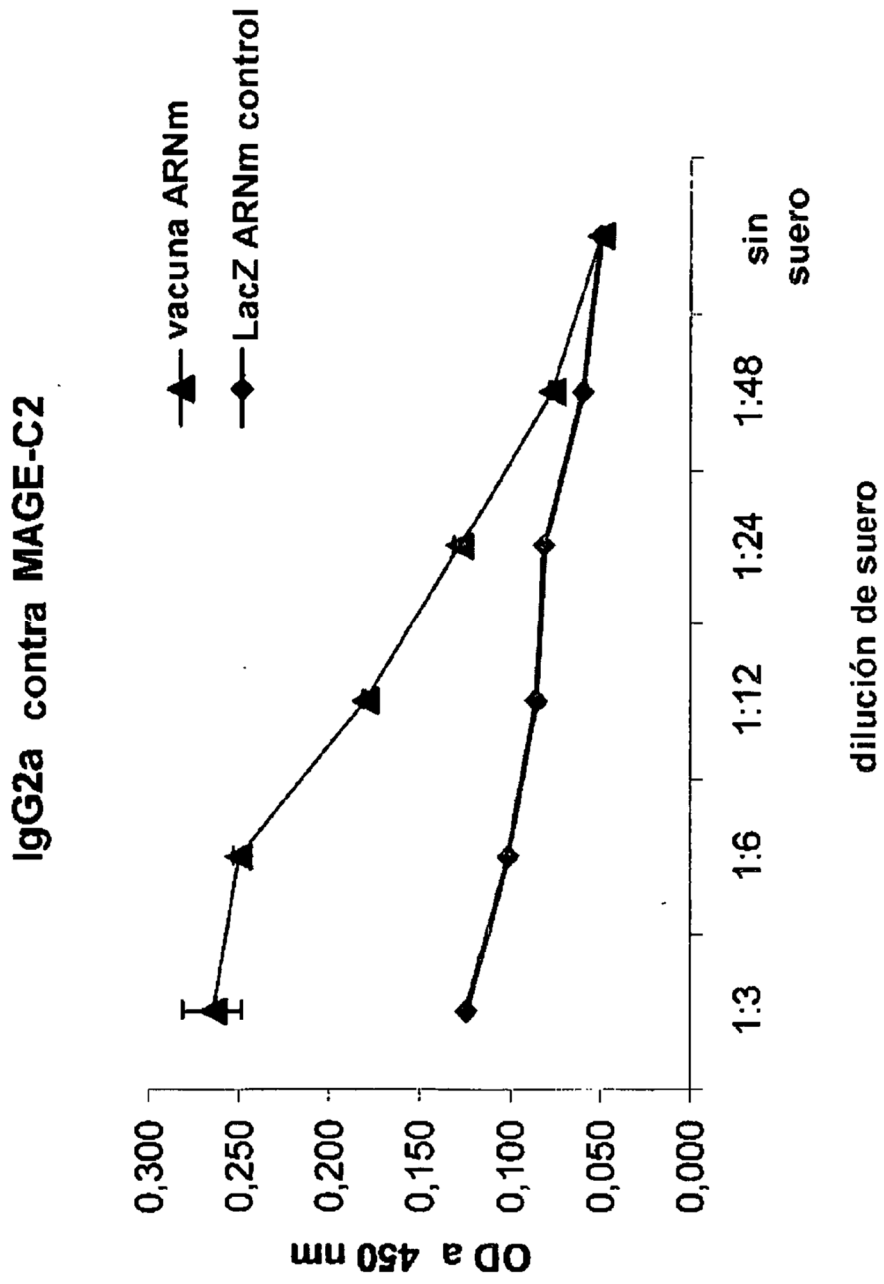


Fig. 32

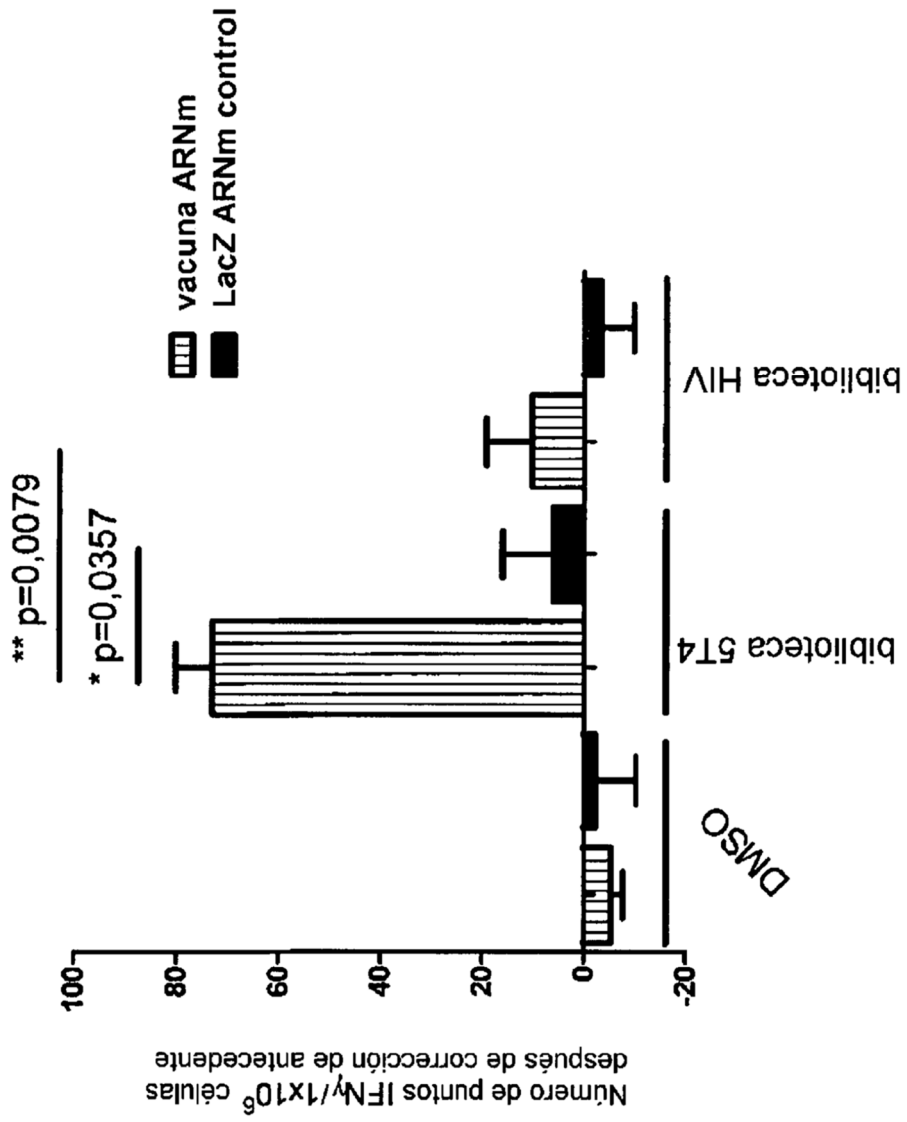


Fig. 33

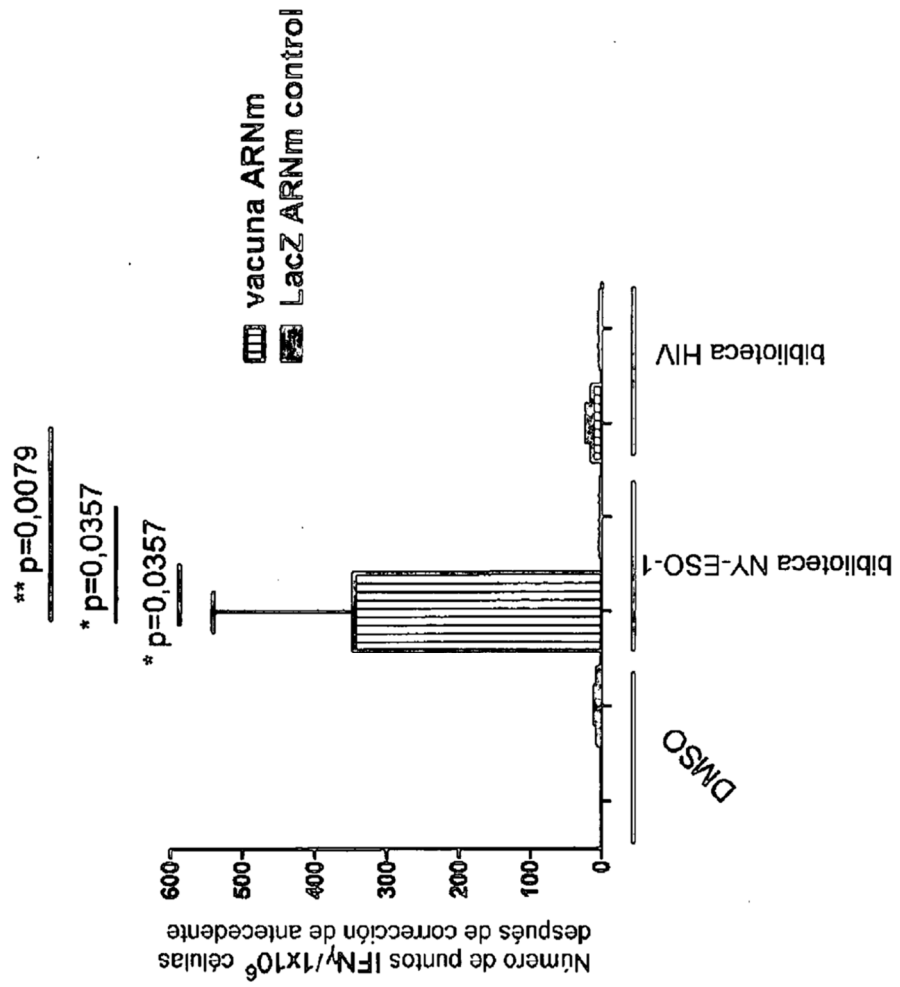


Fig. 34

<p>Compuestos catiónicos o policationicos, comprendiendo péptidos o proteínas catiónicos o policationicos, incluyendo</p> <p>Protamina, nucleolina, espermina o espermidina, poli-L-lisina (PLL), poliarginina, polipéptidos básicos, péptidos de penetración celular (CPP), incluyendo péptidos de unión a VIH, Tat, VIH-Tat 1 (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, péptidos MPG, Pep-1, L-oligómeros, péptidos de calcitonina, péptidos derivados de Antennapedia (en particular de Drosophila antennapedia), pAntp, plsl, FGH, lactoderrina, transportano, buiforina-2, Bac715-24, SynB, SynB(1), pVEC, péptidos derivados de hCT. SAP, protamina, espermina, espermidina o histonas</p>
<p>polisacáridos catiónicos, incluyendo</p> <p>quitosano</p>
<p>polímeros catiónicos, incluyendo polietilenimina (PEI)</p>
<p>Lípidos catiónicos, incluyendo DOTMA: cloruro de [1 -(2,3-sioleiloxi)propil]-N,N,N-trimetilamonio, DMRIE, di-C14-amidina, DOTIM, SAINT, DC-Choi, BGTC, CTAP, DOPC, DODAP, DOPE: Dioleil fosfatidiletanolamina, DOSPA, DODAB, DOIC, DMEPC, DOGS: Dioctadecilamidoglicilespermina, DIMRI: Bromuro de dimiristooxipropil-dimetilhidroxietil-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-oxisuccinilojetil)-trimetilamonio, oligofectamina</p>
<p>polímeros catiónicos o policationicos, incluyendo</p> <p>poliaminoácidos modificados, incluyendo polímeros de β-aminoácidos o poliamidas inversas, polietilenos modificados, incluyendo PVP (bromuro de poli(N-etil-4-vinilpiridinio)), acrilatos modificados, incluyendo pDMAEMA (metilacrilato de polidimetilaminoetilo))</p>
<p>amidoaminas modificadas, incluyendo pAMAM (poli(amidoamina))</p>
<p>polibetaaminoéster (PBAE) modificado, incluyendo</p> <p>polímeros de diamina con extremo modificado con 1,4-butanodiol diacrilato-co-5-amino-1-pentanol</p>
<p>Dendrímeros, incluyendo dendrímeros de polipropilamina o dendrímeros a base de pAMAM</p>
<p>poliimina(s), incluyendo PEI: poli(etilenimina), poli(propilenimina),</p>
<p>polialilamina</p>
<p>polímeros a base de estructuras de azúcar, incluyendo</p> <p>polímeros a base de ciclodextrina, polímeros a base de dextrano, quitosano,</p>
<p>polímeros a base de estructuras silano,</p> <p>como copolímeros de PMOXA-PDMS,</p>

Fig. 35

<p>polímeros en bloque que consisten en una combinación de uno o más bloques catiónicos seleccionados de un polímero catiónico como se menciona arriba y uno o más bloques hidrófilos o hidrófobos (por ejemplo polietilenglicol)</p>
<p>proteínas o péptidos catiónicos o policationicos seleccionados de las siguientes proteínas o péptidos que tienen la siguiente fórmula general (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, independientemente entre sí, pueden ser un número seleccionado de 0, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14 o 15, siempre y cuando el contenido total de Arg, Lys, His y Orn represente al menos un 50% de todos los aminoácidos del oligopéptido; y Xaa puede ser cualquier aminoácido seleccionado de aminoácidos nativos (= que ocurren naturalmente) o no nativos excepto Arg, Lys, His u Orn; y x puede ser cualquier número seleccionado de 0, 1, 2, 3 o 4, siempre y cuando el contenido total de Xaa no exceda el 50% de todos los aminoácidos del oligopéptido</p>
<p>ácidos nucleicos que tienen la fórmula (II): $G_lX_mG_n$, donde: G es guanosina, uracilo o un análogo de guanosina o uracilo; X es guanosina, uracilo, adenosina, timidina, citosina o un análogo de los nucleótidos antes mencionados; l es un entero de 1 a 40, en el que cuando $l = 1$ G es guanosina o un análogo de la misma, cuando $l > 1$ al menos el 50% de los nucleótidos son guanosina o un análogo de la misma; m es un entero y es al menos 3; donde cuando $m = 3$ X es uracilo o un análogo del mismo, cuando $m > 3$ existen al menos 3 uracilos sucesivos o análogos de uracilo; n es un entero de 1 a 40, donde $n = 1$ G guanosina o un análogo de la misma, cuando $n > 1$ al menos el 50% de los nucleótidos son guanosina o análogos de la misma</p>
<p>ácidos nucleicos que tienen la fórmula (III): $C_lX_mC_n$, donde: C es citosina, uracilo o un análogo de citosina o uracilo; X es guanosina, uracilo, adenosina, timidina, citosina o un análogo de los nucleótidos mencionados; l es un entero de 1 a 40, donde cuando $l = 1$ C es citosina o un análogo de la misma, cuando $l > 1$ al menos el 50% de los nucleótidos son citosina o un análogo de la misma; m es un entero y es al menos 3; donde cuando $m = 3$ X es uracilo o un análogo del mismo, cuando $m > 3$ existen al menos 3 uracilos sucesivos o análogos de uracilo; n es un entero de 1 a 40, donde cuando $n = 1$ C es citosina o un análogo de la misma, cuando $n > 1$ al menos el 50% de los nucleótidos son citosina o un análogo de la misma</p>

Fig. 35, continuación