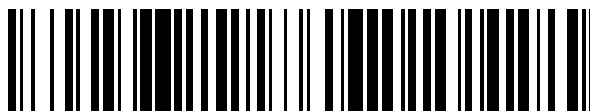


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 739 649**

51 Int. Cl.:

A61K 39/00 (2006.01)

C12N 15/63 (2006.01)

C12N 15/67 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **15.02.2013 E 16001897 (4)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **01.05.2019 EP 3178488**

54 Título: **Ácido nucleico que comprende o codifica para un tallo-bucle de histona y una secuencia poli(a) o una señal de poliadenilación para incrementar la expresión de un antígeno tumoral codificado**

30 Prioridad:
15.02.2012 WO PCT/EP2012/000674

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
03.02.2020

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

72 Inventor/es:
**THESS, ANDREAS;
SCHLAKE, THOMAS y
PROBST, JOCHEN**

74 Agente/Representante:
AZNÁREZ URBIETA, Pablo

ES 2 739 649 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

Ácido nucleico que comprende o codifica para un tallo-bucle de histona y una secuencia poli(a) o una señal de poliadenilación para incrementar la expresión de un antígeno tumoral codificado

5

La presente invención se refiere a un kit o kit de partes que comprende una pluralidad de secuencias de ácido nucleico, comprendiendo o codificando en cada caso para una región codificante, codificando al menos un péptido o proteína comprendido en un antígeno tumoral o un fragmento, variante o derivado del mismo, al menos un tallo-bucle de histona, una secuencia poli(A) y una secuencia poli(c). Además, la presente invención proporciona composiciones y composiciones farmacéuticas que comprenden dichas secuencias de ácido nucleico. La invención proporciona además el uso del kit o kit de partes o de la composición para incrementar la expresión de dicho péptido o proteína codificados *in vitro*. También se refiere a dichos kits o kits de partes, dichas composiciones o composiciones farmacéuticas para su uso como medicamento, por ejemplo para su uso en el tratamiento de enfermedades cancerosas o tumorales. La presente invención describe además un método *in vitro* para aumentar la expresión de un péptido o proteína codificados que emplea el kit o el kit de partes o la composición de la invención. Además, la invención se refiere a ácidos nucleicos específicos y a composiciones farmacéuticas que los contienen, por ejemplo para su uso en el tratamiento de enfermedades cancerosas o tumorales.

Aparte de las enfermedades cardiovasculares e infecciosas, la aparición de tumores y enfermedades cancerosas es una de las causas más frecuentes de muerte en la sociedad moderna y lleva asociada en la mayoría de casos costes considerables en términos de terapia y medidas de rehabilitación subsecuentes. El tratamiento de tumores y enfermedades cancerosas depende en gran medida por ejemplo del tipo de tumor que se presenta, de la edad, la distribución de células cancerosas en el paciente a tratar, etc. La terapia para el cáncer se lleva a cabo convencionalmente hoy en día empleando una terapia de radiación o quimioterapia, además de operaciones invasivas. Sin embargo, tales terapias convencionales suponen típicamente un extraordinario estrés para el sistema inmunitario y, en ciertos casos, se pueden utilizar sólo en un grado limitado. Además, la mayoría de estas terapias convencionales requieren intervalos largos entre los tratamientos individuales para permitir la regeneración del sistema inmunitario.

Por tanto, en los últimos años se han investigado estrategias complementarias a tales "tratamientos convencionales" para evitar o reducir al menos el impacto en el sistema inmunitario de tales tratamientos. Un tratamiento complementario en particular incluye procedimientos terapéuticos génicos o vacunación genética, que ya se ha descubierto que es en gran medida prometedora para el tratamiento o para soportar tales terapias convencionales.

La terapia génica y la vacunación genética son métodos de medicina molecular que ya se han probado en la terapia y prevención de enfermedades y generalmente tienen un efecto considerable en la práctica médica diaria, en particular en el tratamiento de las enfermedades mencionadas anteriormente. Ambos métodos, la terapia génica y la vacunación genética, se basan en introducir ácidos nucleicos en las células o el tejido del paciente y el procesamiento subsecuente de la información codificada por el ácido nucleico que se ha introducido en las células o tejido, es decir la expresión (proteína) de los polipéptidos deseados.

En los procedimientos de terapia génica típicamente se utiliza ADN, aunque el ARN también es conocido en desarrollos recientes. De manera importante, en todos estos procedimientos de terapia génica el ARNm funciona como mensajero para la información de secuencia de la proteína codificada, independientemente si se utiliza ADN, ARN viral o ARNm.

En general, el ARN se considera una molécula inestable: las ARNasas son ubicuas y notoriamente difíciles de inactivar. Adicionalmente, el ARN también es químicamente más lábil que el ADN. Así, es tal vez sorprendente que el "estado por defecto" de un ARNm en una célula eucariótica se caracterice por una estabilidad relativa y se requieren señales específicas para acelerar la degradación de los ARNm individuales. La razón principal de este descubrimiento parece ser la degradación del ARNm dentro de las células, catalizada casi exclusivamente por las exonucleasas. Sin embargo, los extremos de los ARNm eucarióticos están protegidos frente a estas enzimas por estructuras terminales específicas y sus proteínas asociadas: una m7GpppN CAP en el extremo 5' y típicamente una secuencia poli(A) en el extremo 3'. La eliminación de estas dos modificaciones terminales se considera así frontera de la velocidad de degradación del ARNm. Aunque se ha caracterizado un elemento estabilizador en la 3' UTR del ARNm de alfa-globina, las secuencias de ARN que afectan al recambio de los ARNm eucarióticos actúan típicamente como un promotor de la degradación, usualmente al acelerar la desadenilación (revisado por Meyer, S., C. Temme, et al. (2004), Crit Rev Biochem Mol Biol 39(4): 197-216.).

Como se menciona anteriormente, normalmente los extremos 5' de los ARNm eucarióticos están modificados post-transcripcionalmente para llevar una estructura CAP metilada, por ejemplo m7GpppN. Además de las funciones de corte y empalme, estabilización y transporte del ARN, la estructura CAP aumenta significativamente el reclutamiento de la subunidad ribosómica 40S al extremo 5' del ARNm durante el inicio de la traducción. La última función requiere el reconocimiento de la estructura CAP por el complejo de factor de inicio eucariótico eIF4F. La secuencia poli(A) estimula además la traducción a través del reclutamiento incrementado de subunidades 40S a los ARNm, un efecto que requiere

la intervención de la proteína de unión a poli(A) (PABP). La PABP, a su vez, se demostró recientemente que interactúa físicamente con el eIF4G, que es parte del complejo eIF4F unido a CAP. Así, se postuló un modelo de bucle cerrado del inicio de la traducción en los ARNm poliadenilados con caperuza (Michel, Y. M., D. Poncet, et al. (2000), *J Biol Chem* 275(41): 32268-76.).

- 5 Casi todos los ARNm eucarióticos terminan con tal secuencia poli(A) que se agrega a su extremo 3' por la maquinaria de escisión/poliadenilación ubicua. La presencia de una secuencia poli(A) en el extremo 3' es una de las características más reconocibles de los ARNm eucarióticos. Después de la escisión, la mayoría de los pre-ARNm, con excepción de los transcritos de histona dependientes de replicación, adquieren una cola poliadenilada. En este contexto, el procesamiento del extremo 3' es un proceso co-transcripcional nuclear que promueve el transporte de los ARNm del núcleo al citoplasma y afecta a la estabilidad y la traducción de los ARNm. La formación de este extremo 3' ocurre en una reacción de dos etapas dirigida por la maquinaria de escisión/poliadenilación y depende de la presencia de dos elementos de secuencia
- 10 y una secuencia rica en G/U en dirección 3'. En una primera etapa, los pre-ARNm se escinden entre estos dos elementos. En una segunda etapa estrechamente acoplada a la primera etapa el extremo 3' recientemente formado se extiende por la adición de una secuencia poli(A) que consiste en 200–250 adenilatos, que afecta subsecuentemente en todos los aspectos del metabolismo del ARNm, incluyendo exportación, estabilidad y traducción del ARNm (Dominski, Z. y W. F. Marzluff (2007), *Gene* 396(2): 373-90.).

La única excepción conocida de esta regla son los ARNm de histona dependientes de replicación que terminan con un tallo-bucle de histona en lugar de una secuencia poli(A). Secuencias tallo-bucle de histona ilustrativas se describen en

20 López et al. (Dávila López, M. y Samuelsson, T. (2008), *RNA* (Nueva York, N.Y.), 14(1), 1-10. doi:10.1261/rna.782308).

El tallo-bucle de histona de los pre-ARNm es seguido típicamente por una secuencia rica en purina, conocida como elemento en 3' de histona (HDE). Estos pre-ARNm se procesan en el núcleo por una escisión endonucleolítica individual de aproximadamente 5 nucleótidos en 3' del tallo-bucle, catalizada por U7 snRNP a través del emparejamiento de bases del U7 snRNA con el HDE. La secuencia 3' UTR que comprende la estructura tallo-bucle de histona y el elemento en 3' de histona (HDE) (sitio de unión del U7 snRNP) se denominaran usualmente señal de procesamiento 3' de histona (véase por ejemplo Chodchoy, N., N. B. Pandey, et al. (1991). *Mol Cell Biol* 11(1): 497-509.).

25

Debido al requisito de empaquetar el ADN recién sintetizado en la cromatina, la síntesis de la histona se regula de acuerdo con el ciclo celular. La síntesis incrementada de las proteínas de histona durante la fase S se logra por la activación transcripcional de los genes de histona, así como la regulación post-transcripcional de los niveles de ARNm de histona. Se podría demostrar que el tallo-bucle de histona es esencial para todas las etapas post-transcripcionales de la regulación de la expresión de histonas. En necesario para procesar de manera eficiente la exportación del ARNm en el citoplasma, la carga en los polirribosomas y la regulación de la estabilidad del ARNm.

30

En el contexto anterior, se identificó una proteína de 32 kDa, asociada al tallo-bucle de histona en el extremo 3' de los mensajes de histona tanto en el núcleo como en el citoplasma. El nivel de expresión de esta proteína de unión de tallo-bucle (SLBP) está regulada por el ciclo celular y es máximo durante la fase S, cuando se incrementan los niveles de ARNm de histona. El SLBP es necesario para el procesamiento eficiente del extremo 3' del pre-ARNm de histona por el U7 snRNP. Después de la terminación del procesamiento, la SLBP permanece asociada al tallo-bucle en el extremo de los ARNm de histona maduros y estimula su traducción en las proteínas de histona en el citoplasma (Dominski, Z. y W. F. Marzluff (2007), *Gene* 396(2): 373-90). De forma interesante, el dominio de unión a ARN de la SLBP se conserva en todos los metazoarios y protozoarios (Dávila López, M., y Samuelsson, T. (2008), *RNA* (Nueva York, N.Y.), 14(1), 1-10. doi:10.1261/rna.782308) y se podría demostrar que su unión a la secuencia de tallo-bucle de histona es dependiente de la estructura del tallo-bucle y que el sitio de unión mínimo contiene al menos 3 nucleótidos 5' y 2 nucleótidos 3' del tallo-bucle (Pandey, N. B., et al. (1994), *Molecular and Cellular Biology*, 14(3), 1709-1720 y Williams, A. S., y Marzluff, W. F., (1995), *Nucleic Acids Research*, 23(4), 654-662.).

35

Aunque los genes de histona se clasifican generalmente como “dependientes de la replicación”, provocando que el ARNm termine en un tallo-bucle de histona o como “tipo de reemplazo”, provocando que el ARNm lleve una cola poli(A) en su lugar, se han identificado en casos muy raros ARNm de origen natural que contienen tanto un tallo-bucle de histona como un poli(A) u oligo(A) 3' del mismo. Sanchez et al. examinaron el efecto de las colas oligo(A) de origen natural adjuntas al 3' del tallo-bucle de histona del ARNm de histona durante la ovogénesis de *Xenopus* utilizando luciferasa como proteína informadora y encontraron que la cola oligo(A) es una parte activa del mecanismo de represión de la traducción que silencia el ARNm de histona durante la ovogénesis y su eliminación es parte del mecanismo que activa la traducción de los ARNm de histona (Sanchez, R. y W. F. Marzluff (2004), *Mol Cell Biol* 24(6): 2513-25).

40

45

50

Además, los requisitos para la regulación de las histonas dependientes de la replicación en el nivel del procesamiento del pre-ARNm y la estabilidad del ARNm se han investigado utilizando constructos artificiales que codifican la proteína marcadora alfa-Globina, teniendo ventaja el hecho de que el gen de globina contiene intrones a diferencia de los genes de histona, sin intrones. Para este propósito, se generaron constructos donde la secuencia codificadora de alfa-globina se siguió por una señal de tallo-bucle de histona (tallo-bucle de histona seguido por el elemento en 3' de histona) y una señal de poliadenilación (Whitelaw, E., et al. (1986). *Nucleic Acids Research*, 14(17), 7059-7070.; Pandey, N. B., y Marzluff, W. F. (1987). *Molecular and Cellular Biology*, 7(12), 4557-4559.; Pandey, N. B., et al. (1990). *Nucleic Acids*

55

Research, 18(11), 3161-3170).

En otro procedimiento, Lüscher et al. investigaron la regulación dependiente del ciclo celular de un gen H4 de histona recombinante. Se generaron constructos donde la secuencia codificadora de H4 se siguió por una señal de tallo-bucle de histona y una señal de poliadenilación, las dos señales de procesamiento separadas incidentalmente por una secuencia codificadora de galactosidasa (Lüscher, B. et al. (1985). Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 82(13), 4389-4393).

Además, Stauber et al. identificaron la secuencia mínima requerida para conferir regulación por el ciclo celular de los niveles de ARNm de histona H4. Para estas investigaciones, se utilizaron constructos que comprendían una secuencia codificadora del marcador de selección fosforibosil-transferasa de Xantina:guanina (GPT) que precede una señal de tallo-bucle de histona seguido por una señal de poliadenilación (Stauber, C. et al. (1986). EMBO J, 5(12), 3297-3303).

Examinando el procesamiento del pre-ARNm de histona, Wagner et al. identificaron los factores requeridos para la escisión de los pre-ARNm de histona utilizando un constructo reporter, colocando EGFP entre una señal de tallo-bucle de histona y una señal de poliadenilación de forma que la EGFP sólo se expresaba en caso de que se alterara el procesamiento del pre-mRNA de histona (Wagner, E. J. et al. (2007). Mol Cell 28(4), 692-9).

Debe observarse que la traducción del ARNm poliadenilado requiere usualmente que la secuencia 3' poli(A) esté próxima a la 5' CAP. Esto es mediado a través de la interacción proteína-proteína entre la proteína de unión a poli(A) y el factor de inicio eucariótico eIF4G. Con respecto a los ARNm de histona dependientes de la replicación, se ha descubierto un mecanismo análogo. En este contexto, Gallie et al. demuestran que el tallo-bucle de histona es funcionalmente similar a una secuencia poli(A) en que mejora la eficiencia de la traducción y es co-dependiente de una 5'-CAP con el fin de establecer un nivel de traducción eficiente. Mostraron que el tallo-bucle de histona es suficiente y necesario para incrementar la traducción de un ARNm reporter en células de ovario de hámster Chino transfectadas, pero se debe colocar en el extremo 3' con el fin de funcionar óptimamente. Por tanto, de manera similar a la cola poli(A) en los otros ARNm, el extremo 3' de estos ARNm de histona parece ser esencial para la traducción *in vivo* y es funcionalmente análogo a una cola poli(A) (Gallie, D. R., Lewis, N. J., y Marzluff, W. F. (1996), Nucleic Acids Research, 24(10), 1954-1962).

Adicionalmente, se podría demostrar que la SLBP se une al ARNm de histona citoplásmico y se requiere para su traducción. Aunque la SLBP no interactúa directamente con eIF4G, el dominio requerido para la traducción del ARNm de histona interactúa con la proteína recientemente identificada SLIP1. En una etapa adicional, la SLIP1 interactúa con el eIF4G y permite hacer circular el ARNm de histona y soportar la traducción eficiente del ARNm de histona por un mecanismo similar a la traducción de los ARNm poliadenilados.

Como se menciona anteriormente, los procedimientos de terapia génica utilizan normalmente ADN para transferir la información codificadora en la célula, que luego se transcribe en el ARNm, llevando los elementos de origen natural de un ARNm, particularmente la estructura 5'-CAP y la secuencia 3' poli(A) para asegurar la expresión de la proteína terapéutica o antigénica codificada.

Sin embargo, en muchos casos los sistemas de expresión basados en la introducción de tales ácidos nucleicos en la célula o tejido del paciente y la expresión subsecuente de los polipéptidos deseados codificados por estos ácidos nucleicos no muestran el nivel deseado o incluso requerido de expresión que pueda permitir una terapia eficiente, independientemente de si se utiliza ADN o ARN.

En la técnica anterior, hasta ahora se han hecho diferentes intentos para incrementar el rendimiento de la expresión de una proteína codificada, en particular empleando sistemas de expresión mejorados *in vitro* y/o *in vivo*. Los métodos para incrementar la expresión descritos generalmente en la técnica previa se basan convencionalmente en el uso de vectores o casetes de expresión que contienen promotores específicos y elementos de regulación correspondientes. Ya que estos vectores o casetes de expresión se limitan típicamente a los sistemas celulares particulares, estos sistemas de expresión tienen que ser adaptados para el uso en diferentes sistemas celulares. Tales vectores o casetes de expresión adaptados luego se transfectan normalmente en las células y se tratan típicamente en dependencia de la línea celular específica. Por tanto, se da preferencia principalmente a aquellas moléculas de ácidos nucleicos que son capaces de expresar las proteínas codificadas en una célula diana por los sistemas inherentes en la célula, independiente de los promotores y los elementos de regulación que son específicos para los tipos de células particulares. En este contexto, se puede distinguir entre elementos estabilizadores de ARNm y elementos que incrementan la eficiencia de traducción del ARNm.

ARNm que se optimizan en su secuencia codificadora y que son generalmente adecuados para un propósito se describen en la solicitud WO 02/098443 (CureVac GmbH). Por ejemplo, la WO 02/098443 describe un ARNm que se estabiliza en forma general y se optimiza para la traducción en sus regiones codificadoras. La WO 02/098443 describe además un método para determinar las modificaciones de secuencia. La WO 02/098443 también describe posibilidades de sustituir los nucleótidos de adenina y uracilo en las secuencias de ARNm con el fin de incrementar el contenido de guanina/citosina (G/C) de las secuencias. De acuerdo con la WO 02/098443, tales sustituciones y adaptaciones para incrementar el contenido de G/C se pueden utilizar para las aplicaciones terapéuticas génicas, pero también para las vacunas genéticas en el tratamiento de cáncer o enfermedades infecciosas. En este contexto, la WO 02/098443 menciona en general secuencias como una secuencia base para tales modificaciones, donde el ARNm modificado codifica al menos un péptido o polipéptido biológicamente activo que se traduce en el paciente a tratar, por ejemplo, ya sea nada en absoluto o

inadecuadamente o con defectos. Alternativamente, la WO 02/098443 propone un ARNm que codifica antígenos, por ejemplo antígenos tumorales o virales, como una secuencia base para tales modificaciones.

5 En un procedimiento adicional para incrementar la expresión de una proteína codificada, la solicitud WO 2007/036366 describe el efecto positivo de secuencias poli(A) largas (particularmente más largas de 120 pb) y la combinación de al menos dos regiones no traducidas 3' del gen de beta-globina en la estabilidad del ARNm y la actividad de traducción.

10 La WO 2011/069529 A1 (CureVac GmbH) describe combinaciones específicas de ácidos nucleicos que codifican antígenos tumorales, incluyendo NY-ESO-1, 5T4, survivina, MAGE-C1 y MAGE-C2. Russel et al. enseñan que la beta-globina, la alfa-globina y las histonas tienen elementos dentro de la 3'-UTR que son capaces de estabilizar un ARN. Ninguno de los documentos sugiere combinar secuencias poli(A) y tallos-bucle de histona para aumentar la expresión de antígenos tumorales codificados gracias a su efecto sinérgico.

15 Sin embargo, aunque todos estos últimos documentos de la técnica previa ya tratan de proporcionar herramientas muy eficientes para los procedimientos de terapia génica y una estabilidad del ARNm y una actividad de traducción además mejoradas, aún persiste el problema de una estabilidad generalmente más baja de aplicaciones basadas en ARN frente a las vacunas de ADN y procedimientos terapéuticos génicos basados en ADN. Por consiguiente, existe aún una necesidad en la técnica de herramientas mejoradas para los procedimientos de terapia génica y la vacunación genética o como una terapia complementaria a tratamientos convencionales como se plantea anteriormente que permita una mejor provisión de proteínas codificadas *in vivo*, por ejemplo mediante una estabilidad del ARNm y/o actividad de traducción mejoradas, preferentemente para la terapia y la vacunación genética.

20 Además, a pesar de todos los progresos en la técnica, la expresión eficiente del péptido o proteína codificada en los sistemas sin células, células u organismos (expresión recombinante) es aún un problema difícil.

25 Por tanto, el objetivo que subyace a la presente invención es proporcionar métodos adicionales y/o alternativos para incrementar la expresión de una proteína codificada, preferentemente mediante la estabilización adicional del ARNm y/o un incremento de la eficiencia de la traducción de tal ARNm con respecto a tales ácidos nucleicos conocidos de la técnica anterior, para su uso en la vacunación genética en el tratamiento terapéutico o profiláctico de enfermedades cancerosas o tumorales.

Este objetivo se resuelve por el contenido de las reivindicaciones adjuntas. Particularmente, de acuerdo con un primer aspecto, el objetivo subyacente de la presente invención se resuelve mediante un kit o kit de partes que comprende:

- 30 A) un ácido nucleico que comprende o codifica para una región codificante, donde la región codificante codifica al menos un péptido o proteína, que comprende el antígeno tumoral NY-ESO-1 o un fragmento del mismo;
- B) un ácido nucleico que comprende o codifica para una región codificante, donde la región codificante codifica al menos un péptido o proteína, que comprende el antígeno tumoral 5T4 o un fragmento del mismo;
- C) un ácido nucleico que comprende o codifica para una región codificante, donde la región codificante codifica al menos un péptido o proteína, que comprende el antígeno tumoral survivina o un fragmento del mismo;
- 35 D) un ácido nucleico que comprende o codifica para una región codificante, donde la región codificante codifica al menos un péptido o proteína, que comprende el antígeno tumoral MAGE-C1 o un fragmento del mismo;
- E) un ácido nucleico que comprende o codifica para una región codificante, donde la región codificante codifica al menos un péptido o proteína, que comprende el antígeno tumoral MAGE-C2 o un fragmento del mismo;

donde el fragmento de NY-ESO-1, 5T4, survivina, MAGE-C1 o MAGE-C2 tiene una longitud de al menos seis residuos aminoácidos; donde cada secuencia de ácido nucleico A, B, C, D o E, en la dirección 5' a 3', comprende o codifica para

- 40 i) a) la región codificante
- b) al menos un tallo-bucle de histona, y
- c) una secuencia poli(A);
- o
- ii) a) la región codificadora
- 45 b) una secuencia poli(A); y
- c) al menos un tallo-bucle de histona;

donde el al menos un tallo-bucle de histona en i) o ii) se selecciona de las fórmulas (I) o (II) como se definen aquí;

donde

tallo 1 y tallo 2 son capaces de un emparejamiento de bases uno con el otro

forman una secuencia inversa complementaria, pudiendo suceder el apareamiento de bases entre tallo 1 y tallo 2 o

forman parcialmente una secuencia inversa complementaria, pudiendo suceder un apareamiento de bases incompleto entre tallo 1 y tallo 2 y

- 5 donde cada ácido nucleico A, B, C, D o E comprende o codifica además para una secuencia poli(C) que comprende al menos 10 nucleótidos citidina.

Dicho kit o kit de partes preferentemente es adecuado para aumentar la expresión de dichos péptidos o proteínas codificados.

- 10 Secuencias tallo-bucle diferentes a aquellas secuencias tallo-bucle de histona (derivadas de genes de histona, en particular genes de histona de las familias H1, H2A, H2B, H3 y H4) también son conocidas en la técnica.

En este contexto, es particularmente preferente que los ácidos nucleicos como se definen aquí, en particular aquellos del kit o kit de partes de la invención según el primer aspecto de la presente invención, se produzcan al menos en parte mediante síntesis de ADN o ARN o sean ácidos nucleicos aislados.

- 15 La presente invención se basa en el sorprendente descubrimiento de los presentes inventores de que la combinación de una secuencia poli(A) y al menos un tallo-bucle de histona, incluso aunque ambos representen mecanismos alternativos en la naturaleza, actúa sinérgicamente, ya que esta combinación incrementa la expresión proteica muchas veces por encima del nivel observado con cualquiera de los elementos individuales. El efecto sinérgico de la combinación de poli(A) y al menos un tallo-bucle de histona se observa independientemente del orden de la poli(A) y el tallo-bucle de histona y de la longitud de la secuencia poli(A).

- 20 Por tanto, las secuencias de ácidos nucleicos como se definen aquí, en particular aquellas del kit o kit de partes de la invención, comprenden o codifican, entre otras, para a) una región de codificación, que codifica al menos un péptido o proteína que comprende un antígeno tumoral o un fragmento, variante o derivado del mismo; b) al menos un tallo-bucle de histona y c) una secuencia poli(A) o una secuencia de poliadenilación; preferentemente para incrementar el nivel de expresión de dicho péptido o proteína codificada. En algunas realizaciones puede ser preferible que la proteína codificada no sea una proteína histona, en particular no una proteína de histona de la familia de histonas H4, H3, H2A y/o H2B o un fragmento, variante o derivado de las mismas que retiene la función tipo histona, es decir formar un nucleosoma. Además, la proteína codificada típicamente no corresponde a una proteína ligadora de histonas de la familia de las histonas H1. Las moléculas de ácido nucleico como se definen aquí, en particular aquellas del kit o del kit de partes de la invención, típicamente no contienen ninguna señal reguladora (5' y/o, particularmente, 3' de un gen de histona de ratón, en particular no de un gen de histona de ratón H2A y, además, con mayor referencia, no del gen de histona de ratón H2A614. En particular, no contienen un tallo-bucle de histona y/o una señal de procesamiento de tallo-bucle de un gen de histona de ratón, en particular no del gen de histona de ratón H2A y, preferiblemente, no del gen de histona de ratón H2A614.

- 35 Igualmente, los ácidos nucleicos como se definen aquí, en particular aquellos del kit o kit de partes de la invención, típicamente no proporcionan una proteína reporter (por ejemplo luciferasa, GFP, EGFP, β -galactosidasa, particularmente EGFP galactoquinasa (galK) y/o una proteína marcadora o de selección (por ejemplo alfa-globina, galactoquinasa y xantina:guanina fosforibosil transferasa (GPT)) o una proteína reporter bacteriana, por ejemplo cloranfenicol acetil transferasa (CAT) u otras proteínas bacterianas de resistencia a los antibióticos, por ejemplo derivadas del neogen bacteriano en su elemento (a).

- 40 Una proteína reporter, marcadora o de selección se entiende típicamente que no es un antígeno tumoral de acuerdo con la invención. Una proteína reporter, marcadora o de selección o su gen subyacente se utiliza comúnmente como herramienta de investigación en bacterias, cultivos celulares, animales o plantas. Confieren a los organismos (de manera preferente heterológamente) que las expresan una propiedad fácilmente identificable que se puede medir o que puede permitir la selección. Específicamente, las proteínas marcadoras o de selección tienen una función seleccionable. Típicamente, tales proteínas de selección, marcadoras o reporter no son de origen natural en humanos u otros mamíferos, sino que derivan de otros organismos, en particular de bacterias o plantas. Por consiguiente, las proteínas con función de selección, marcadora o reporter que se originan de especies diferentes a los mamíferos, en particular diferentes a los humanos, se excluyen preferentemente de ser entendidas como proteínas con la propiedad de actuar como "antígeno tumoral" de acuerdo con la presente invención. En particular, una proteína de selección, marcadora o reporter permite identificar células transformadas mediante ensayos *in vitro*, basados por ejemplo en técnicas de fluorescencia u otras técnicas espectroscópicas, y de resistencia a los antibióticos. Así, los genes de selección, informadores o reporter que proporcionan tales propiedades a las células transformadas típicamente no se entiende que sean proteínas que actúan como un antígeno tumoral de acuerdo con la invención *in vivo*.

En cualquier caso, las proteínas reporter, marcadoras o de selección no ejercen usualmente ninguna de las propiedades antigénicas tumorales y, por tanto, no ejercen un efecto inmunológico que permite terapéuticamente tratar enfermedades tumorales. Si cualquier proteína reporter, marcadora o de selección individual no obstante lo debe hacer (además de su función reporter, de selección o marcadora), tal proteína reporter, marcadora o de selección preferentemente no se entiende como un "antígeno tumoral" dentro del significado de la presente invención.

Por el contrario, una proteína o péptido que actúa como un antígeno tumoral (en particular excluyendo genes de histona de las familias H1, H2A, H2B, H3 y H4) de acuerdo con la presente invención no muestra típicamente una función de selección, marcadora o reporter. Si cualquier "antígeno tumoral" no obstante lo debe hacer (además de su función antigénica tumoral), tal antígeno tumoral preferentemente no se entiende como una "proteína de selección, marcadora o reporter" dentro del significado de la presente invención.

Con total preferencia se entiende que una proteína que actúa como antígeno tumoral de acuerdo con la invención deriva de mamíferos, en particular de humanos, en particular de tumores de mamífero, y no se califica como proteína de selección, marcadora o reporter. En particular, tales antígenos tumorales se derivan de tumores de mamíferos, en particular de humanos. Se entiende que estas proteínas antigénicas tumorales son antigénicas, ya que se proponen para tratar al sujeto al desencadenar la respuesta inmunitaria del sujeto, de manera que se habilita su sistema inmunitario para combatir las células tumorales por las respuestas inmunes TH1 y/o TH2. Por consiguiente, tales proteínas tumorales antigénicas son típicamente proteínas de mamífero, en particular humanas, que caracterizan el tipo de cáncer del sujeto.

Por consiguiente, se prefiere que la región codificadora (a) que codifica al menos un péptido o proteína sea heteróloga a al menos (b) el al menos un tallo-bucle de histona. En otras palabras, "heterólogo" en el contexto de la presente invención significa que la al menos una secuencia de tallo-bucle no se presenta naturalmente como una secuencia (reguladora) (por ejemplo en la 3' UTR) del gen específico que codifica la proteína o péptido (antigénico tumoral) del elemento (a) del ácido nucleico como se define aquí, en particular aquel del kit o kit de partes de la invención. Por consiguiente, el tallo-bucle (histona) de cada uno de dichos ácidos nucleicos se deriva preferentemente de la 3'UTR de un gen diferente al que comprende la región codificadora del elemento (a) del ácido nucleico inventivo. Por ejemplo, la región codificadora del elemento (a) no codificará una proteína de histona o un fragmento, variante o derivado de la misma (que retiene la función de una proteína de histona) si los ácidos nucleicos son heterólogos, pero codificará cualquier otro péptido o secuencia (de la misma u otra especie) que ejerce una función biológica, preferentemente una función antigénica tumoral, diferente a la función (similar) a histona, por ejemplo codificará una proteína que ejerce una función antigénica tumoral, por ejemplo en términos de una vacunación frente a tumores de mamífero, en particular humanos que desencadenan en consecuencia una reacción inmunológica frente a las células tumorales del sujeto, que expresa de manera preferente el antígeno tumoral codificado por el ácido nucleico inventivo.

En este contexto, los ácidos nucleicos como se definen aquí, en particular aquellos del kit o kit de partes de la invención, comprenden o codifican en la dirección 5' a 3' para:

- a) una región codificadora que codifica al menos un péptido o proteína que comprende un antígeno tumoral o un fragmento, variante o derivado del mismo;
- b) al menos un tallo-bucle de histona, opcionalmente sin un elemento en 3' aguas abajo de histona (HDE) respecto al tallo-bucle de histona
- c) una secuencia poli(A) o una señal de poliadenilación.

El término "elemento aguas abajo de histona (HDE)" se refiere a una cadena de polinucleótidos rica en purina de aproximadamente 15 a 20 nucleótidos en 3' respecto al tallo-bucle de histona de origen natural, que representa el sitio de unión para el U7 snARN implicado en el procesamiento del pre-ARNm de histona en el ARNm de histona maduro. Por ejemplo, en los erizos de mar el HDE es CAAGAAAGA (Dominski, Z. y W. F. Marzluff (2007), Gene 396(2): 373-90).

Además, es preferible que los ácidos nucleicos como se definen aquí, en particular aquellos del kit o kit de partes de la invención, no comprendan un intrón.

Alternativamente, las secuencias de ácido nucleico como se definen aquí, en particular aquellos del kit o kit de partes de la invención, comprenden o codifican de 5' a 3' para:

- a) una región codificadora que codifica preferentemente al menos un péptido o proteína que comprende un antígeno tumoral o un fragmento, variante o derivado del mismo;
- c) una secuencia poli(A); y
- b) al menos un tallo-bucle de histona.

Las secuencias de ácido nucleico como se definen aquí, en particular aquellos del kit o kit de partes de la invención, comprenden cualquier ácido nucleico adecuado, por ejemplo seleccionado de cualquier ADN (de hebra individual o doble

hebra), preferentemente aunque sin que se limite al mismo por ejemplo ADN genómico, ADN de plásmido, moléculas de ADN de hebra individual, moléculas de ADN de doble hebra, o se puede seleccionar por ejemplo de cualquier ANP (ácido nucleico peptídico) o se puede seleccionar por ejemplo de cualquier ARN (de hebra individual o doble hebra), preferentemente un ARN mensajero (ARNm); etc. Dichas secuencias de ácido nucleico también pueden comprender un ARN viral (ARNv). Sin embargo, dichas secuencias de ácido nucleico pueden no ser un ARN viral o puede no contener un ARN viral. Más específicamente, las secuencias de ácido nucleico pueden no contener elementos de secuencia virales, por ejemplo potenciadores o promotores virales (por ejemplo ningún promotor viral inactivado o elementos de secuencia, más específicamente no inactivado por estrategias de reemplazo), u otros elementos de secuencia virales o elementos de ácidos nucleicos virales o retrovirales. Más específicamente, dichas secuencias de ácido nucleico pueden no ser un vector retroviral o viral o un vector retroviral o viral modificado.

En cualquier caso, las secuencias de ácido nucleico como se definen aquí, en particular aquellos del kit o kit de partes de la invención, pueden o no contener una secuencia potenciadora y/o promotora, que se puede modificar o no o que se pueda activar o no. El potenciador y/o promotor puede ser expresable en plantas o no expresable y/o expresable en eucariotas o no expresable y/o expresable en procariotas o no expresable. Las secuencias de ácido nucleico como se definen aquí, en particular aquellos del kit o kit de partes de la invención, pueden contener o no una secuencia que codifica un ribosoma (auto-corte y empalme).

En realizaciones específicas, las secuencias de ácido nucleico como se definen aquí, en particular aquellos del kit o kit de partes de la invención, pueden ser o pueden comprender un ARN de auto replicación (replicón).

De manera preferente, las secuencias de ácido nucleico como se definen aquí, en particular aquellos del kit o kit de partes de la invención, son un ADN de plásmido o un ARN, particularmente un ARNm.

En realizaciones particulares del primer aspecto de la presente invención, los ácidos nucleicos como se definen aquí, en particular aquellos del kit o kit de partes de la invención, son secuencias de ácido nucleico comprendidas en ácidos nucleicos adecuados para la transcripción *in vitro*, particularmente en un vector de transcripción *in vitro* apropiado (por ejemplo un plásmido o una secuencia de ácido nucleico lineal que comprende promotores específicos para la transcripción *in vitro*, tales como los promotores T3, T7 o Sp6).

En realizaciones preferidas particulares adicionales del primer aspecto de la presente invención, los ácidos nucleicos como se definen aquí, en particular aquellos del kit o kit de partes de la invención, están comprendidos en ácidos nucleicos adecuados para la transcripción y/o traducción en un sistema de expresión (por ejemplo en un vector o plásmido de expresión), particularmente un sistema de expresión procariótico (por ejemplo bacterias como *E. coli*) o eucariótico (por ejemplo células de mamíferos como células CHO, células de levadura o células de insecto u organismos enteros como plantas o animales).

El término "sistema de expresión" significa un sistema (cultivo celular u organismos enteros) que es adecuado para la producción de péptidos, proteínas o ARN, particularmente ARNm (expresión recombinante).

Las secuencias de ácido nucleico como se definen aquí, en particular aquellos del kit o kit de partes de la invención de acuerdo con el primer aspecto de la presente invención, comprenden o codifican al menos un tallo-bucle de histona como se define aquí. En el contexto de la presente invención, tal tallo-bucle de histona en general (independientemente de si es un tallo-bucle de histona o no) se deriva típicamente de genes de histona y comprende un emparejamiento de bases intramolecular de dos secuencias complementarias total o parcialmente inversas vecinas, que forman así un tallo-bucle. Un tallo-bucle puede presentarse en el ADN de hebra individual o más comúnmente en el ARN. La estructura también es conocida como horquilla o bucle de horquilla y usualmente consiste en un tallo y un bucle (terminal) dentro de una secuencia consecutiva donde el tallo está formado por dos secuencias complementarias completa o parcialmente inversas vecinas separadas por una secuencia corta a modo de espaciador, que construye el bucle de la estructura del tallo-bucle. Las dos secuencias complementarias completa o parcialmente inversas vecinas se pueden definir por ejemplo por los elementos tallo-bucle tallo 1 y tallo 2. El tallo-bucle se forma cuando estas dos secuencias complementarias completa o parcialmente inversas vecinas, por ejemplo elementos de tallo-bucle tallo 1 y tallo 2, forman pares bases entre sí, conduciendo a una cadena de secuencia de ácido nucleico de doble hebra que comprende un bucle no emparejado en su extremo terminal, formado por la secuencia corta situada entre los elementos de tallo-bucle tallo 1 y tallo 2 en la secuencia consecutiva. El bucle no emparejado representa así típicamente una región del ácido nucleico que no es capaz de emparejamiento por bases con cualquiera de estos elementos de tallo-bucle. La estructura en forma de paleta resultante es un bloque de construcción clave de muchas estructuras secundarias de ARN. La formación de una estructura de tallo-bucle es así dependiente de la estabilidad de las regiones del tallo y bucle resultantes, donde el primer requisito es típicamente la presencia de una secuencia que se puede plegar sobre sí misma de nuevo para formar una hebra doble emparejada. La estabilidad de los elementos de tallo-bucle emparejados se determina por la longitud, el número de emparejamientos erróneos o protuberancias que contienen (un número pequeño de emparejamientos erróneos es típicamente tolerable, especialmente en una cadena de doble hebra larga) y la composición de bases de la región emparejada. En el contexto de la presente descripción, una longitud de bucle de 3 a 15 bases es concebible, mientras que una longitud de bucle preferente es 3-10 bases, de manera más preferente 3 a 8, 3 a 7, 3 a 6 o incluso de manera más preferente 4 a 5 bases, y de manera especialmente preferente 4 bases. Aquí se describe que la secuencia de tallo que forma la estructura de doble hebra tiene típicamente una longitud de entre 5 a 10 bases, preferentemente entre 5 a 8

bases.

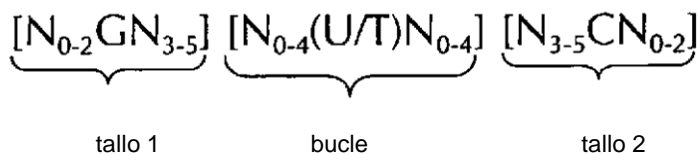
En el contexto de la presente invención, un tallo-bucle de histona se deriva típicamente de genes de histona (por ejemplo genes de las familias de histona H1, H2A, H2B, H3, H4) y comprende un emparejamiento de bases intramolecular de dos secuencias completa o parcialmente complementarias inversas vecinas que forman así un tallo-bucle. Típicamente, un tallo-bucle de UTR 3' de histona es un elemento de ARN implicado en el transporte nucleocitoplásmico de los ARNm de histona y en la regulación de la estabilidad y de la eficiencia de traducción en el citoplasma. Los ARNm de los genes de histona de metazoarios carecen de poliadenilación y está presente una cola poli-A en lugar del procesamiento del extremo 3' en un sitio entre este tallo-bucle altamente conservado y una región rica en purina de aproximadamente 20 nucleótidos en 3' (el elemento aguas abajo de histona o HDE). El tallo-bucle de histona se une por una proteína de unión de tallo-bucle de 31 kDa (SLBP – también llamada proteína de unión de horquilla de histona, o HBP). Tales estructuras de tallo-bucle de histona son empleadas por la presente invención preferentemente en combinación con otros elementos y estructuras de secuencia que no se presentan naturalmente (lo que significa en organismos/ células vivas no transformadas) en genes de histona, pero que se combinan – de acuerdo con la invención – para proporcionar un ácido nucleico heterólogo, artificial. Por consiguiente, la presente invención se basa particularmente en el descubrimiento de que una combinación artificial (no nativa) de una estructura de tallo-bucle de histona con otros elementos de secuencia heterólogos que no se presentan en los genes de histona o los genes de histona de metazoarios y se aíslan de las regiones de secuencia operacionales y/o reguladoras (que afectan la transcripción y/o traducción) de los genes que codifican proteínas diferentes a las histonas proporcionan efectos ventajosos. Por consiguiente, un aspecto de la invención proporciona la combinación de una estructura de tallo-bucle de histona con una secuencia poli(A) (3' terminal de una región codificante), que no se presenta en los genes de histona de metazoarios, en los ácidos nucleicos como se definen aquí, en particular aquellos del kit o kit de partes de la invención. De acuerdo con otro aspecto preferente de la invención, se proporciona una combinación de una estructura de tallo-bucle de histona con una región codificadora que codifica una proteína antigénica tumoral, que preferentemente no se presenta en los genes de histona de metazoarios (la región codificadora y la secuencia de tallo-bucle de histona son heterólogos) como se definen aquí, en particular aquellos del kit o kit de partes de la invención. Se prefiere que tales proteínas antigénicas tumorales sean de un mamífero, de manera preferente humano, que sufre una enfermedad tumoral. En una realización preferida adicional, todos los elementos (a), (b) y (c) de los ácidos nucleicos como se definen aquí, en particular aquellos del kit o kit de partes de la invención, son heterólogos entre sí y se combinan artificialmente de tres fuentes diferentes, por ejemplo (a) la región codificadora de proteína antigénica tumoral de un gen humano, (b) el tallo-bucle de histona de la región no traducida de un gen de histona de metazoario, por ejemplo mamífero no humano o humano y (c) la secuencia poli(A) de por ejemplo una región no traducida de un gen diferente al gen de histona y diferente de la región no traducida de la región codificadora de antígeno tumoral de acuerdo con el elemento (a) de tal ácido nucleico.

Por tanto, un tallo-bucle de histona es una estructura de tallo-bucle como se describe aquí, que muestra/retiene la propiedad de unión a su socio de unión natural, la proteína de unión de tallo-bucle (SLBP – también llamada la proteína de unión de horquilla de histona, o HBP).

De acuerdo con la presente invención, la secuencia de tallo-bucle de histona de acuerdo con el componente (b) de la reivindicación 1 puede no derivar de una proteína de histona de ratón. Más específicamente, la secuencia de tallo-bucle de histona puede no derivar del gen de histona de ratón H2A614. También, el ácido nucleico de la invención puede no contener una secuencia de tallo-bucle de histona de ratón ni tampoco contener un gen de histona de ratón H2A614. Además, las secuencias de ácido nucleico como se definen aquí, en particular aquellos del kit o kit de partes de la invención, puede no contener una señal de procesamiento de tallo-bucle, más específicamente una señal de procesamiento de histona de ratón, y mucho más específicamente puede no contener una señal de procesamiento de tallo-bucle de ratón H2kA614, aun si la secuencia de ácido nucleico inventiva puede contener al menos un gen de histona de mamífero. Sin embargo, el al menos un gen de histona de mamífero puede no tener la Seq. ID No. 7 de WO 01/12824.

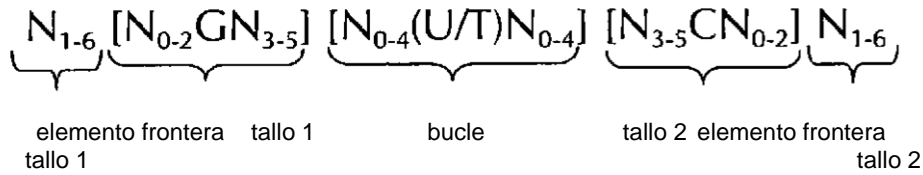
De acuerdo con el primer aspecto inventivo, las secuencias de ácido nucleico como se definen aquí, en particular aquellos del kit o kit de partes de la invención, comprenden o codifican al menos una secuencia tallo-bucle de histona, de manera preferente de acuerdo con al menos una de las siguientes formulas (I) o (II):

fórmula (I) (secuencia tallo-bucle sin elementos frontera de tallo):



50

fórmula (II) (secuencia de tallo-bucle con elementos frontera de tallo):



5 donde:

los elementos frontera N_{1-6} de tallo 1 o tallo 2 es una secuencia consecutiva de 1 a 6, de manera preferente de 2 a 6, de manera más preferente de 2 a 5, aún de manera más preferente de 3 a 5, de manera mucho más preferente de 4 a 5 o 5 N, donde cada N se selecciona independientemente de un nucleótido seleccionado de A, U, T, G y C, o un análogo de nucleótido del mismo;

10 tallo 1 $[N_{0-2}GN_{3-5}]$ es una complementariedad inversa o complementariedad parcialmente inversa con el elemento tallo 2, y es una secuencia consecutiva de entre 5 a 7 nucleótidos; donde N_{0-2} es una secuencia consecutiva de 0 a 2, de manera preferente de 0 a 1, de manera más preferente de 1 N, en donde cada N se selecciona independientemente de un nucleótido seleccionado de A, U, T, G y C o un análogo de nucleótido del mismo; donde N_{3-5} es una secuencia consecutiva de 3 a 5, de manera preferente de 4 a 5, de manera más preferente de 4 N, en donde cada N se selecciona independientemente de otro de un nucleótido seleccionado de A, U, T, G y C o un análogo de nucleótido del mismo, y donde G es guanosina o un análogo de la misma, y se puede reemplazar opcionalmente por una citidina o un análogo de la misma, con la condición de que su citidina de nucleótido complementaria en el tallo 2 se reemplace por guanosina;

15 la secuencia de bucle $[N_{0-4}(U/T)N_{0-4}]$ se sitúa entre los elementos tallo 1 y tallo 2, y es una secuencia consecutiva de 3 a 5 nucleótidos, de manera más preferente de 4 nucleótidos; donde cada N_{0-4} es independientemente una secuencia consecutiva de 0 a 4, de manera preferente de 1 a 3, de manera más preferente de 1 a 2 N, en donde cada N se selecciona independientemente de otro de un nucleótido seleccionado de A, U, T, G y C o un análogo de nucleótido del mismo; y donde U/T representa uridina, u opcionalmente timidina;

20 tallo 2 $[N_{3-5}CN_{0-2}]$ es complementariedad inversa o complementariedad parcialmente inversa con el elemento tallo 1 y es una secuencia consecutiva entre 5 a 7 nucleótidos; donde N_{3-5} es una secuencia consecutiva de 3 a 5, de manera preferente de 4 a 5, de manera más preferente de 4 N, en donde cada N se selecciona independientemente de un nucleótido seleccionado de A, U, T, G y C o un análogo de nucleótido del mismo; donde N_{0-2} es una secuencia consecutiva de 0 a 2, de manera preferente de 0 a 1, de manera más preferente de 1 N, en donde cada N se selecciona independientemente de un nucleótido seleccionado de A, U, T, G o C o un análogo de nucleótido del mismo; y donde C es citidina o un análogo de la misma, y se puede reemplazar opcionalmente por una guanosina o un análogo de la misma con la condición de que su guanosina de nucleótido complementaria en el tallo 1 se reemplace por citidina;

25 donde

tallo 1 y tallo 2 son capaces de un emparejamiento de bases entre sí formando una secuencia complementaria inversa, donde el emparejamiento de bases puede presentarse entre el tallo 1 y tallo 2, por ejemplo por el emparejamiento de bases de Watson-Crick de nucleótidos A y U/T o G y C o por el emparejamiento de bases de no Watson-Crick, por ejemplo emparejamiento de bases oscilante, emparejamiento de bases de Watson-Crick inverso, emparejamiento de bases de Hoogsteen, emparejamiento de bases de Hoogsteen inverso, o son capaces del emparejamiento de bases entre sí formando una secuencia complementaria parcialmente inversa, donde un emparejamiento de bases incompleto puede presentarse entre tallo 1 y tallo 2, en base a que una o más bases en un tallo no tienen una base complementaria en la secuencia complementaria inversa del otro tallo.

35 En el contexto anterior, un emparejamiento de bases oscilante es típicamente un emparejamiento de bases no de Watson-Crick entre dos nucleótidos. Los cuatro pares de bases oscilantes principales que se pueden utilizar en este contexto son guanosina-uridina, inosina-uridina, inosina-adenosina, inosina-citidina (G-U/T, I-U/T, I-A e I-C) y adenosina-citidina (A-C).

Por consiguiente, en el contexto de la presente invención, una base oscilante es una base que forma un par de bases oscilantes con una base adicional como se describe anteriormente. Por tanto, el emparejamiento de bases no de Watson-Crick, por ejemplo el emparejamiento de bases oscilante, puede presentarse en el tallo de la estructura de tallo-bucle de histona de acuerdo con la presente invención.

45 En el contexto anterior, una secuencia complementaria parcialmente inversa comprende como máximo 2, de manera preferente solo un emparejamiento erróneo en la estructura de tallo de la secuencia de tallo-bucle formada por el emparejamiento de bases de tallo 1 y tallo 2. En otras palabras, el tallo 1 y el tallo 2 preferentemente son capaces de emparejamiento de bases (completo) entre sí a lo largo de la secuencia completa de tallo 1 y tallo 2 (100% de los emparejados de base de Watson-Crick o no de Watson-Crick correctos posibles), formando así una secuencia complementaria inversa, donde cada base tiene su control de base de Watson-Crick o no de Watson-Crick correcto como

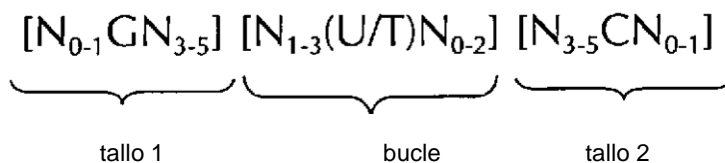
5 compañero de unión complementario. Alternativamente, el tallo 1 y el tallo 2 preferentemente son capaces de emparejamiento de bases parcial entre sí a lo largo de la secuencia completa de tallo 1 y tallo 2, donde al menos aproximadamente un 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, o 95% del 100% de los emparejamiento de bases de Watson-Crick o no de Watson-Crick posibles correctos se ocupan con los emparejamientos de bases de Watson-Crick o no de Watson-Crick correctos y como máximo aproximadamente un 30%, 25%, 20%, 15%, 10%, o 5% de las bases restantes no están emparejadas.

10 De acuerdo con una realización preferente del primer aspecto inventivo, la al menos una secuencia de tallo-bucle de histona (con elementos frontera de tallo) de las secuencias de ácido nucleico como se definen aquí, en particular aquellos del kit o kit de partes de la invención, comprenden una longitud de aproximadamente 15 a aproximadamente 45 nucleótidos, de manera preferente una longitud de aproximadamente 15 a aproximadamente 40 nucleótidos, de manera preferente una longitud de aproximadamente 15 a aproximadamente 35 nucleótidos, de manera preferente una longitud de aproximadamente 15 a aproximadamente 30 nucleótidos y de manera aún más preferente una longitud de aproximadamente 20 a aproximadamente 30 y de manera mucho más preferente una longitud de aproximadamente 24 a aproximadamente 28 nucleótidos.

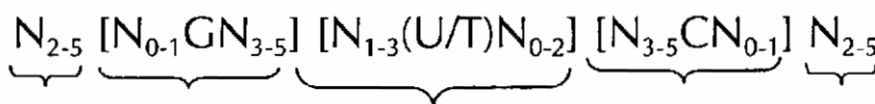
15 De acuerdo con una realización preferente adicional del primer aspecto inventivo, la al menos una secuencia de tallo-bucle de histona (sin elementos frontera de tallo) de las secuencias de ácido nucleico como se definen aquí, en particular aquellos del kit o kit de partes de la invención, comprenden una longitud de aproximadamente 10 a aproximadamente 30 nucleótidos, de manera preferente una longitud de aproximadamente 10 a aproximadamente 20 nucleótidos, de manera preferente una longitud de aproximadamente 12 a aproximadamente 20 nucleótidos, de manera preferente una longitud de aproximadamente 14 a aproximadamente 20 nucleótidos y de manera aún más preferente una longitud de aproximadamente 16 a aproximadamente 17 y de manera mucho más preferente una longitud de aproximadamente 16 nucleótidos.

25 De acuerdo con una realización preferida adicional del primer aspecto inventivo, las secuencias de ácido nucleico como se definen aquí, en particular aquellos del kit o kit de partes de la invención, de acuerdo con el primer aspecto de la presente invención, pueden comprender o codificar para al menos una secuencia de tallo-bucle de histona de acuerdo con al menos una de las siguientes fórmulas específicas (Ia) o (IIa):

fórmula (Ia) (secuencia tallo-bucle sin elementos frontera de tallo):



30 fórmula (IIa) (secuencia tallo-bucle con elementos frontera de tallo):

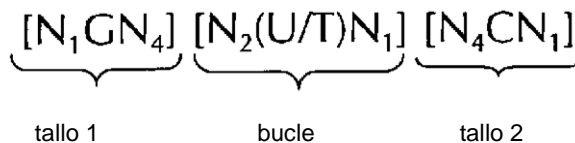


elemento frontera tallo 1 tallo 1 bucle tallo 2 elemento frontera tallo 2

donde N, C, G, T y U son como se definen anteriormente.

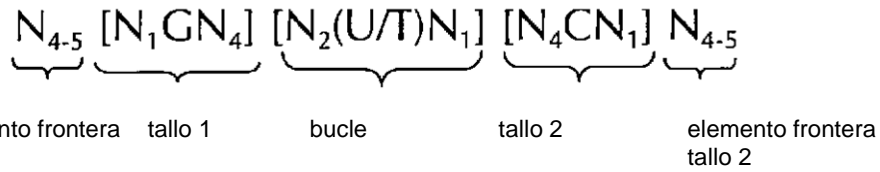
35 De acuerdo con una realización particularmente preferida adicional del primer aspecto, las secuencias de ácido nucleico como se definen aquí, en particular aquellos del kit o kit de partes de la invención, pueden comprender o codificar para al menos una secuencia tallo-bucle de histona de acuerdo con al menos una de las siguientes fórmulas específicas (Ib) o (IIb):

fórmula (Ib) (secuencia de tallo-bucle sin elementos frontera de tallo):



40

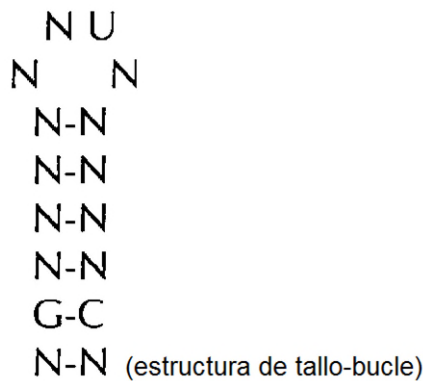
fórmula (IIb) (secuencia de tallo-bucle con elementos frontera de tallo):



donde N, C, G, T y U son como se definen anteriormente.

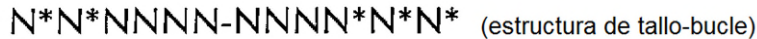
- 5 De acuerdo con una realización aún más preferida del primer aspecto inventivo, las secuencias de ácido nucleico como se definen aquí, en particular aquellos del kit o kit de partes de la invención, de acuerdo con el primer aspecto de la presente invención, pueden comprender o codificar al menos una secuencia tallo-bucle de histona de acuerdo con al menos una de las siguientes fórmulas específicas (Ic) a (Ih) o (IIc) a (IIh), mostradas alternativamente en su estructura tallo-bucle y como una secuencia lineal que representa las secuencias de tallo-bucle de histona como se generan de acuerdo con el Ejemplo 1:

fórmula (Ic): (secuencia consenso de tallo-bucle de histona de metazoarios y protozoarios sin elementos frontera de tallo):



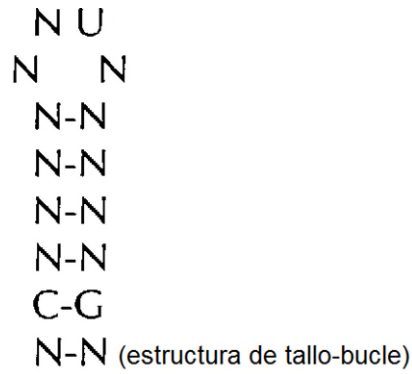
(secuencia lineal) (SEQ ID NO: 1)

- 15 fórmula (IIc): (secuencia consenso de tallo-bucle de histona de metazoarios y protozoarios con elementos frontera de tallo):



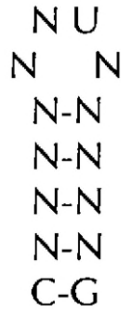
(secuencia lineal) (SEQ ID NO: 2)

fórmula (Id): (sin elementos frontera de tallo)



NCNNNNNNUNNNNNGN
 (secuencia lineal) (SEQ ID NO: 3)

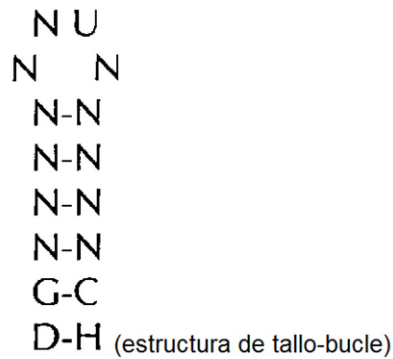
fórmula (IIId): (con elementos frontera de tallo)



N*N*NNNN-NNNN*N*N* (estructura de tallo-bucle)

N*N*NNNNNCNNNNNNUNNNNNGNNNN*N*N*
 (secuencia lineal) (SEQ ID NO: 4)

fórmula (IIe): (secuencia consenso de tallo-bucle de histona de protozoario sin elementos frontera de tallo)



DGNNNNNNUNNNNCH
 (secuencia lineal) (SEQ ID NO: 5)

fórmula (IIe): (secuencia consenso de tallo-bucle de histona de protozoario con elementos frontera de tallo)

N U
 N N
 N-N
 N-N
 N-N
 N-N
 G-C

N*N*NNND-HNNN*N*N* (estructura de tallo-bucle)

N*N*NNNDGNNNNNNUNNNNNCHNNN*N*N*

(secuencia lineal) (SEQ ID NO: 6)

fórmula (If): (secuencia consenso de tallo-bucle de histona de metazoario sin elementos frontera de tallo)

N U
 N N
 Y-V
 Y-N
 B-D
 N-N
 G-C
 N-N (estructura de tallo-bucle)

NGNBYNNUNVNDNCN

(secuencia lineal) (SEQ ID NO: 7)

fórmula (If): (secuencia consenso de tallo-bucle de histona de metazoario con elementos frontera de tallo)

N U
 N N
 Y-V
 Y-N
 B-D
 N-N
 G-C

N*N*NNNN-NNNN*N*N* (estructura de tallo-bucle)

N*N*NNNNGNBYNNUNVNDNCNNNN*N*N*

(secuencia lineal) (SEQ ID NO: 8)

fórmula (Ig): (secuencia consenso de tallo-bucle de histona de vertebrado sin elementos frontera de tallo)

N U
D H
Y-A
Y-B
Y-R
H-D
G-C
N-N (estructura de tallo-bucle)

NGHYYYDNUHABRDCN
(secuencia lineal) (SEQ ID NO: 9)

fórmula (IIg): (secuencia consenso de tallo-bucle de histona de vertebrado con elementos frontera de tallo)

N U
D H
Y-A
Y-B
Y-R
H-D
G-C

N*N*HNNN-NNNN*N*H* (estructura de tallo-bucle)

N*N*HNNNGHYYYDNUHABRDCNNNN*N*H*

5 (secuencia lineal) (SEQ ID NO: 10)

fórmula (IIh): (secuencia consenso de tallo-bucle de histona de ser humano (Homo sapiens) sin elementos frontera de tallo)

Y U
D H
U-A
C-S
Y-R
H-R
G-C
D-C (estructura de tallo-bucle)

DGHYCUDYUHASRRCC
(secuencia lineal) (SEQ ID NO: 11)

10 fórmula (IIh): (secuencia consenso de tallo-bucle de histona de ser humano (Homo sapiens) con elementos frontera de tallo)

Y U
D H
U-A
C-S
Y-R
H-R
G-C

N*H*AAHD-CVHB*N*H* (estructura de tallo-bucle)

N*H*AAHDGHYCUDYUHASRRCCVHB*N*H*
(secuencia lineal) (SEQ ID NO: 12)

donde en cada una de las fórmulas anteriores (Ic) a (Ih) o (IIc) a (IIh):

- 5 N, C, G, A, T y U son como se definen anteriormente;
 cada U se puede reemplazar por T;
 cada G o C (altamente) conservada en los elementos tallo 1 y 2 se puede reemplazar por su base de nucleótidos complementaria C o G, con la condición de que su nucleótido complementario en el tallo correspondiente se reemplace por su nucleótido complementario en paralelo; y/o
 G, A, T, U, C, R, Y, M, K, S, W, H, B, V, D, y N son bases de nucleótidos como se definen en la siguiente Tabla:

abreviatura	bases de nucleótidos	observaciones
G	G	Guanina
A	A	Adenina
T	T	Timina
U	U	Uracilo
C	C	Citosina
R	G o A	Purina
Y	T/U o C	Pirimidina
M	A o C	Amino
K	G o T/U	Ceto
S	G o C	Fuerte (uniones 3H)
W	A o T/U	Débil (uniones 2H)
H	A o C o T/U	No G
B	G o T/U o C	No A
V	G o C o A	No T/U
D	G o A o T/U	No C
N	G o C o T/U o A	Cualquier base
*	Presente o no	La base puede estar o no presente

10

En este contexto, se prefiere particularmente que la secuencia tallo-bucle de histona de acuerdo con al menos una de las fórmulas (I) o (Ia) a (Ih) o (II) o (IIa) a (IIh) de la presente invención se seleccione de una secuencia tallo-bucle de histona de origen natural, con especial preferencia de secuencias tallo-bucle de histona de protozoarios o metazoarios y aún de manera particularmente de secuencias tallo-bucle de histona de vertebrados y de manera mucho más preferida de mamífero, especialmente de secuencias tallo-bucle de histona humanas.

15

De acuerdo con una realización particularmente preferida del primer aspecto, la secuencia tallo-bucle de histona de acuerdo con al menos una de las fórmulas específicas (I) o (Ia) a (Ih) o (II) o (IIa) a (IIh) de la presente invención es una secuencia tallo-bucle de histona que comprende en cada posición de nucleótidos el nucleótido que se presenta más frecuentemente o cualquiera que sea el más frecuente o el segundo nucleótido que se presenta mucho más frecuentemente en las secuencias tallo-bucle de histona de origen natural en los metazoarios y protozoarios (Figura 1), protozoarios (Figura 2), metazoarios (Figura 3), vertebrados (Figura 4) y seres humanos (Figura 5) como se muestra en las figuras 1-5. En este contexto se prefiere particularmente que al menos el 80%, de manera preferente al menos el 85% o de manera mucho más preferente al menos el 90% de todos los nucleótidos correspondan al nucleótido que se presenta más frecuentemente en las secuencias tallo-bucle de histona de origen natural. En una realización particular adicional del primer aspecto, la secuencia tallo-bucle de histona de acuerdo con al menos una de las fórmulas específicas (I) o (Ia) a (Ih) de la presente invención se selecciona de las siguientes secuencias tallo-bucle de histona (sin elementos frontera de

20

25

tallo) que representan las secuencias tallo-bucle de histona como se generan de acuerdo con el Ejemplo 1:

VGYYYYHHTHRVVRCB (SEQ ID NO: 13 de acuerdo con la fórmula (Ic))

SGYYTTYTMARRRCS (SEQ ID NO: 14 de acuerdo con la fórmula (Ic))

SGYYCTTTMAGRRCS (SEQ ID NO: 15 de acuerdo con la fórmula (Ic))

5 DGNNNBNNTHVNNNCH (SEQ ID NO: 16 de acuerdo con la fórmula (Ie))

RGNNNYHBTHRDNNCY (SEQ ID NO: 17 de acuerdo con la fórmula (Ie))

RGNDYHYTHRDHNCY (SEQ ID NO: 18 de acuerdo con la fórmula (Ie))

VGYYTYHTRVRCB (SEQ ID NO: 19 de acuerdo con la fórmula (If))

SGYYCTTYMAGRRCS (SEQ ID NO: 20 de acuerdo con la fórmula (If))

10 SGYYCTTTMAGRRCS (SEQ ID NO: 21 de acuerdo con la fórmula (If))

GGYYCTTYTHAGRRCC (SEQ ID NO: 22 de acuerdo con la fórmula (Ig))

GGCYCTTYMAGRGCC (SEQ ID NO: 23 de acuerdo con la fórmula (Ig))

GGCTCTTTMAGRGCC (SEQ ID NO: 24 de acuerdo con la fórmula (Ig))

DGHYCTDYTHASRRCC (SEQ ID NO: 25 de acuerdo con la fórmula (Ih))

15 GGCYCTTTTHAGRGCC (SEQ ID NO: 26 de acuerdo con la fórmula (Ih))

GGCYCTTTMAGRGCC (SEQ ID NO: 27 de acuerdo con la fórmula (Ih))

Además en este contexto, las siguientes secuencias tallo-bucle de histona (con elementos frontera de tallo) como se generan de acuerdo con el Ejemplo 1 de acuerdo con una de las fórmulas específicas (II) o (IIa) a (IIh) son particularmente preferentes:

20 H*H*HHVVGYYYYHHTHRVVRCBVHH*N*N* (SEQ ID NO: 28 de acuerdo con la fórmula (IIc))

M*H*MHMSGYYTTYTMARRRCSMCH*H*H* (SEQ ID NO: 29 de acuerdo con la fórmula (IIc))

M*M*MMMSGYYCTTTMAGRRCSACH*M*H* (SEQ ID NO: 30 de acuerdo con la fórmula (IIc))

N*N*NNNDGNNNBNNTHVNNNCHNHN*N*N* (SEQ ID NO: 31 de acuerdo con la fórmula (IIe))

N*N*HHNRGNNNYHBTHRDNNCYDHH*N*N* (SEQ ID NO: 32 de acuerdo con la fórmula (IIe))

25 N*H*HHVRGNDBYHYTHRDHNCYRHH*H*H* (SEQ ID NO: 33 de acuerdo con la fórmula (IIe))

H*H*MHMVGYYTYHTRVRCBVMH*H*N* (SEQ ID NO: 34 de acuerdo con la fórmula (IIf))

M*M*MMMSGYYCTTYTMAGRRCSMCH*H*H* (SEQ ID NO: 35 de acuerdo con la fórmula (IIf))

M*M*MMMSGYYCTTTMAGRRCSACH*M*H* (SEQ ID NO: 36 de acuerdo con la fórmula (IIf))

H*H*MAMGGYYCTTYTHAGRRCCVHN*N*M* (SEQ ID NO: 37 de acuerdo con la fórmula (IIg))

30 H*H*AAMGGCYCTTYTMAGRGCCVCH*H*M* (SEQ ID NO: 38 de acuerdo con la fórmula (IIg))

M*M*AAMGGCTTTTTMAGRGCCMCY*M*M* (SEQ ID NO: 39 de acuerdo con la fórmula (IIg))

N*H*AAHDGHYCTDYTHASRRCCVHB*N*H* (SEQ ID NO: 40 de acuerdo con la fórmula (IIh))

H*H*AAMGGCYCTTTTHAGRGCCVMY*N*M* (SEQ ID NO: 41 de acuerdo con la fórmula (IIh))

H*M*AAAGGCYCTTTMAGRGCCRMY*H*M* (SEQ ID NO: 42 de acuerdo con la fórmula (IIh))

35 De acuerdo con una realización preferida adicional del primer aspecto inventivo, las secuencias de ácido nucleico como se definen aquí, en particular aquellos del kit o kit de partes de la invención, comprenden o codifican al menos una secuencia tallo-bucle de histona que tiene al menos aproximadamente un 80%, de manera preferente al menos aproximadamente 85%, de manera más preferente al menos aproximadamente 90%, o de manera aún más preferente al menos aproximadamente un 95% de identidad de secuencia con los nucleótidos no conservados a 100% conservados de

las secuencias tallo-bucle de histona de acuerdo con al menos una de las fórmulas específicas (I) o (Ia) a (Ih) o (II) o (IIa) a (IIh) o con una secuencia tallo-bucle de histona de origen natural.

5 En una realización preferida, la secuencia tallo-bucle de histona no contiene la secuencia de bucle 5'-UUUC-3'. De manera más específica, el tallo-bucle de histona no contiene la secuencia tallo 1 5'-GGCUCU-3' y/o la secuencia tallo 2 5'-AGAGCC-3', respectivamente. En otra realización preferida, la secuencia tallo-bucle no contiene la secuencia de bucle 5'-CCUGCCC-3' o la secuencia de bucle 5'-UGAAU-3'. De manera más específica, el tallo-bucle no contiene la secuencia tallo 1 5'-CCUGAGC-3' o no contiene la secuencia tallo 1 5'-ACCUUUCUCCA-3' y/o la secuencia 2 5'-GCUCAGG-3' o 5'-UGGAGAAAGGU-3', respectivamente. También, siempre que la invención no se limite a las secuencias tallo-bucle de histona específicamente, las secuencias tallo-bucle preferentemente no se derivan de una región 3' no traducida del receptor de insulina de mamífero. También, de manera preferente, el ácido nucleico inventivo puede no contener señales de procesamiento de tallo-bucle de histona, en particular no aquellas derivadas del gen H2A614 del gen de histona de ratón (H2kA614).

15 Las secuencias de ácido nucleico como se definen aquí, en particular aquellos del kit o kit de partes de la invención, de acuerdo con el primer aspecto de la presente invención, comprenden o codifican una secuencia poli(A). Tal secuencia poli(A) puede comprender una secuencia de aproximadamente 25 a aproximadamente 400 nucleótidos de adenosina, de manera preferente una secuencia de aproximadamente 30 o, de manera más preferente, de aproximadamente 50 a aproximadamente 400 nucleótidos de adenosina, de manera más preferente una secuencia de aproximadamente 50 a aproximadamente 300 nucleótidos de adenosina, de manera aún más preferente una secuencia de aproximadamente 50 a aproximadamente 250 nucleótidos de adenosina, de manera mucho más preferente una secuencia de aproximadamente 60 a aproximadamente 250 nucleótidos de adenosina. En este contexto, el término "aproximadamente" se refiere a una desviación de $\pm 10\%$ del o de los valores a los que está unido. Por consiguiente, la secuencia poli(A) contiene al menos 25 o más de 25, de manera más preferente, al menos 30, de manera más preferente al menos 50 de nucleótidos de adenosina. Por tanto, tal secuencia poli(A) no contiene típicamente menos de 20 nucleótidos de adenosina. De manera más particular, no contiene 10 y/o menos de 10 nucleótidos de adenosina.

25 De manera preferente, los ácidos nucleicos como se definen aquí, en particular aquellos del kit o kit de partes de la invención, no contienen uno o dos de al menos uno o todos menos uno o todos los componentes del grupo consistente en: una secuencia que codifica una ribozima (de manera preferente una ribozima de auto-corte y empalme), una secuencia de ácido nucleico viral, una señal de procesamiento de tallo-bucle de histona, en particular una secuencia de procesamiento de tallo-bucle de histona derivada del gen H2A614 de histona de ratón, un gen Neo, una secuencia promotora inactivada y una secuencia potenciadora inactivada. De manera aún más preferente, los ácidos nucleicos como se definen aquí, en particular aquellos del kit o kit de partes de la invención, no contienen una ribozima, de manera preferente una ribozima de auto-corte y empalme, y uno del consistente en: un gen Neo, una secuencia promotora inactivada, una secuencia potenciadora inactivada, una señal de procesamiento de tallo-bucle de histona, en particular una secuencia de procesamiento de tallo-bucle de histona derivada del gen H2A614 de histona de ratón. Por consiguiente, en una realización preferente, los ácidos nucleicos como se definen aquí, en particular aquellos del kit o kit de partes de la invención, pueden no contener una ribozima, de manera preferente de una ribozima de auto-corte y empalme, tampoco un gen Neo o, alternativamente, ni una ribozima, de manera preferente una ribozima de auto-corte y empalme, tampoco cualquier gen de resistencia (por ejemplo, usualmente aplicado para selección). En otra forma preferente, los ácidos nucleicos como se definen aquí, en particular aquellos del kit o kit de partes de la invención, pueden no contener una ribozima, de manera preferente una ribozima de auto-corte y empalme ni tampoco una señal de procesamiento de tallo-bucle de histona, en particular una secuencia de procesamiento de tallo-bucle de histona derivada del gen H2A614 de histona de ratón.

45 Las señales de poliadenilación, que se define aquí como señales que llevan la poliadenilación a un ARNm (transcrito) por factores de proteína específicos (por ejemplo factor de especificidad de escisión y poliadenilación (CPSF), factor de estimulación de escisión (CstF), factores I y II de escisión (CF I y CF II), poli(A) polimerasa (PAP)), son también conocidas en la técnica. En este contexto, las señales de poliadenilación consenso pueden comprender la secuencia consenso NN(U/T)ANA. Específicamente, las señales de poliadenilación pueden comprender una de la siguientes secuencias: AA(U/T)AAA o A(U/T)(U/T)AAA (donde la uridina está usualmente presente en el ARN y la timidina está usualmente presente en el ADN). En algunos casos, las señales de poliadenilación utilizadas en los ácidos nucleicos no corresponden al U3 snARN, U5, la señal de procesamiento de poliadenilación del gen humano G-CSF o las secuencias señal de poliadenilación SV40. En particular, las señales de poliadenilación anteriores en algunos casos pueden no combinarse con ningún gen de resistencia a antibióticos (o cualquier otro gen reporter, marcador o de selección), en particular no con el gen *neo* de resistencia (neomicina-fosfotransferasa). En algunos casos, cualquiera de las señales de poliadenilación anteriores pueden no combinarse con el tallo-bucle de histona o la señal de procesamiento de tallo-bucle de histona del gen de histona de ratón H2A614.

55 Como se define en las reivindicaciones, el kit o kit de partes de acuerdo con el primer aspecto de la presente invención comprende ácidos nucleicos que codifican para NY-ESO-1, 5T4, survivina, MAGE-C1 y MAGE-C2, o un fragmento de los mismos. También se describe aquí que las secuencias de ácido nucleico pueden codificar además una proteína o un péptido que comprende un antígeno tumoral o un fragmento, variante o derivado del mismos.

Los antígenos tumorales se sitúan de manera preferente sobre la superficie de la célula (tumoral) que caracteriza un tumor de mamífero, en particular humano (por ejemplo en enfermedades tumorales sistémicas o sólidas). Los antígenos tumorales también se pueden seleccionar de proteínas que se sobre-expresan en las células tumorales en comparación con una célula normal. Adicionalmente, los antígenos tumorales también incluyen antígenos expresados en las células que no son (fueron) en sí mismas (u originalmente no en sí mismas) degeneradas, pero se asocian al supuesto tumor. Los antígenos que se conectan con los vasos proveedores de tumor o (re)formación de los mismos, en particular aquellos antígenos que se asocian con la neovascularización, por ejemplo factores de crecimiento como VEGF, bFGF etc., también se incluyen aquí. Los antígenos conectados con un tumor incluyen adicionalmente antígenos de células o tejidos que se incluyen típicamente en el tumor. Además, algunas sustancias (usualmente proteínas o péptidos) se expresan en pacientes que padecen (a sabiendas o no a sabiendas) una enfermedad cancerosa y se presentan en concentraciones incrementadas en los fluidos corporales de tales pacientes. Estas sustancias también son referidas como "antígenos tumorales", sin embargo no son antígenos en el significado estricto de una sustancia inductora de una respuesta inmunitaria. La clase de antígenos tumorales se puede dividir además en antígenos específicos de tumor (TSA) y antígenos asociados a tumor (TAA). Los TSA también se pueden presentar por las células tumorales y nunca por células "sanas" normales. Típicamente resultan de una mutación específica de tumor. Los TAA, que son más comunes, se presentan usualmente tanto por las células tumorales como sanas. Estos antígenos son reconocidos y la célula presentadora de antígeno se puede destruir por células T citotóxicas. Adicionalmente, los antígenos tumorales también se pueden presentar sobre la superficie del tumor en forma de, por ejemplo, un receptor mutado. En este caso, se pueden reconocer por los anticuerpos.

Además, los antígenos asociados a tumor se pueden clasificar como antígenos específicos de tejido, también llamados antígenos específicos de melanocitos, antígenos de cáncer de testículo y antígenos específicos de tumor. Se entiende que los antígenos de cáncer de testículo típicamente son péptidos o proteínas de genes asociados a la línea germinal que se pueden activar en una amplia variedad de tumores. Los antígenos de cáncer de testículo humano se pueden subdividir adicionalmente en antígenos que están codificados en el cromosoma X, llamados así antígenos CT-X, y aquellos antígenos que no están codificados en el cromosoma X, los llamados antígenos CT no X. Los antígenos de cáncer de testículo que están codificados en el cromosoma X comprenden, por ejemplo, la familia de los genes de antígenos de melanoma, la llamada familia MAGE. Los genes de la familia MAGE se pueden caracterizar por un dominio de homología MAGE compartido (MHD). Cada uno de estos antígenos, es decir antígenos específicos de melanocitos, antígenos de cáncer de testículo y antígenos específicos de tumor, pueden inducir una respuesta inmunitaria celular y humoral autóloga. Por consiguiente, el antígeno tumoral codificado por las secuencias de ácido nucleico como se definen aquí, en particular aquellas del kit o kit de partes de la invención, preferentemente es un antígeno específico de melanocitos, un antígeno de cáncer de testículo o antígenos específicos de tumor, de manera preferente pueden ser un antígeno CT-X, antígenos CT no X, un compañero de unión para un antígeno CT-X o un compañero de unión para un antígeno CT no X o un antígeno específico de tumor, de manera más preferente un antígeno CT-X, un compañero de unión para un antígeno CT no X o un antígeno específico de tumor.

Antígenos tumorales particularmente preferentes se seleccionan de la lista consistente en 5T4, 707-AP, 9D7, AFP, AlbZIP HPG1, alfa-5-beta-1-integrina, alfa-5-beta-6-integrina, alfa-actinina-4/m, alfa-metilacil-coenzima A racemasa, ART-4, ARTC1/m, B7H4, BAGE-1, BCL-2, bcr/abl, beta-catenina/m, BING-4, BRCA1/m, BRCA2/m, CA 15-3/CA 27-29, CA 19-9, CA72-4, CA125, calreticulina, CAMEL, CASP-8/m, catepsina B, catepsina L, CD19, CD20, CD22, CD25, CDE30, CD33, CD4, CD52, CD55, CD56, CD80, CDC27/m, CDK4/m, CDKN2A/m, CEA, CLCA2, CML28, CML66, COA-1/m, proteína similar a coactosina, collage XXIII, COX-2, CT-9/BRD6, Cten, ciclina B1, ciclina D1, cyp-B, CYPB1, DAM-10, DAM-6, DEK-CAN, EFTUD2/m, EGFR, ELF2/m, EMMPRIN, EpCam, EphA2, EphA3, ErbB3, ETV6-AML1, EZH2, FGF-5, FN, Frau-1, G250, GAGE-1, GAGE-2, GAGE-3, GAGE-4, GAGE-5, GAGE-6, GAGE7b, GAGE-8, GDEP, GnT-V, gp100, GPC3, GPNMB/m, HAGE, HAST-2, hepsina, Her2/neu, HERV-K-MEL, HLA-A*0201-R17I, HLA-A11/m, HLA-A2/m, HNE, homeosecuencia NKX3.1, HOM-TES-14/SCP-1, HOM-TES-85, HPV-E6, HPV-E7, HSP70-2M, HST-2, hTERT, iCE, IGF-1R, IL-13Ra2, IL-2R, IL-5, receptor de laminina inmadura, calicreína-2, calicreína-4, Ki67, KIAA0205, KIAA0205/m, KK-LC-1, K-Ras/m, LAGE-A1, LDLR-FUT, MAGE-A1, MAGE-A2, MAGE-A3, MAGE-A4, MAGE-A6, MAGE-A9, MAGE-A10, MAGE-A12, MAGE-B1, MAGE-B2, MAGE-B3, MAGE-B4, MAGE-B5, MAGE-B6, MAGE-B10, MAGE-B16, MAGE-B17, MAGE-C1, MAGE-C2, MAGE-C3, MAGE-D1, MAGE-D2, MAGE-D4, MAGE-E1, MAGE-E2, MAGE-F1, MAGE-H1, MAGEL2, mamaglobina A, MART-1/melan-A, MART-2, MART-2/m, proteína de matriz 22, MC1R, M-CSF, ME1/m, mesotelina, MG50/PXDn, MMP11, antígeno MN/CA IX, MRP-3, MUC-1, MUC-2, MUM-1/m, MUM-2/m, MUM-3/m, miosina clase I/m, NA88-A, N-acetilglucosaminiltransferasa-V, Neo-PAP, Neo-PAP/m, NFYC/m, NGEP, NMP22, NPM/ALK, N-Ras/m, NSE, NY-ESO-B, NY-ESO-1, OA1, OFA-iLRP, OGT, OGT/m, OS-9, OS-9/m, osteocalcina, osteopontina, p15, bcr-
 40
 45
 50
 55
 60
 65
 70
 75
 80
 85
 90
 95
 100
 105
 110
 115
 120
 125
 130
 135
 140
 145
 150
 155
 160
 165
 170
 175
 180
 185
 190
 195
 200
 205
 210
 215
 220
 225
 230
 235
 240
 245
 250
 255
 260
 265
 270
 275
 280
 285
 290
 295
 300
 305
 310
 315
 320
 325
 330
 335
 340
 345
 350
 355
 360
 365
 370
 375
 380
 385
 390
 395
 400
 405
 410
 415
 420
 425
 430
 435
 440
 445
 450
 455
 460
 465
 470
 475
 480
 485
 490
 495
 500
 505
 510
 515
 520
 525
 530
 535
 540
 545
 550
 555
 560
 565
 570
 575
 580
 585
 590
 595
 600
 605
 610
 615
 620
 625
 630
 635
 640
 645
 650
 655
 660
 665
 670
 675
 680
 685
 690
 695
 700
 705
 710
 715
 720
 725
 730
 735
 740
 745
 750
 755
 760
 765
 770
 775
 780
 785
 790
 795
 800
 805
 810
 815
 820
 825
 830
 835
 840
 845
 850
 855
 860
 865
 870
 875
 880
 885
 890
 895
 900
 905
 910
 915
 920
 925
 930
 935
 940
 945
 950
 955
 960
 965
 970
 975
 980
 985
 990
 995

MAGE-A6 de acuerdo con el número de acceso NM_005363), MAGE-C1, MAGE-C2, melan-A (por ejemplo melan-A de acuerdo con el número de acceso NM_005511), GP100 (por ejemplo GP100 de acuerdo con el número de acceso M77348), tirosinasa (por ejemplo tirosinasa de acuerdo con el número de acceso NM_000372), survivina (por ejemplo survivina de acuerdo con el número de acceso AF077350), CEA (por ejemplo CEA de acuerdo con el número de acceso NM_004363), Her-2/neu (por ejemplo Her-2/neu de acuerdo con el número de acceso M11730), WT1 (por ejemplo WT1 de acuerdo con el número de acceso NM_000378), PRAME (por ejemplo PRAME de acuerdo con el número de acceso NM_006115), EGFR1 (receptor del factor de crecimiento epidérmico 1) (por ejemplo EGFR1 (receptor del factor de crecimiento epidérmico 1) de acuerdo con el número de acceso AF288738), MUC1, mucina-1 (por ejemplo mucina-1 de acuerdo con el número de acceso NM_002456), SEC61G (por ejemplo SEC61G de acuerdo con el número de acceso NM_014302), hTERT (por ejemplo hTERT número de acceso NM_198253), 5T4 (por ejemplo 5T4 de acuerdo con el número de acceso NM_006670), TRP-2 (por ejemplo TRP-2 de acuerdo con el número de acceso NM_001922), STEAP1, PCA, PSA, PSMA, etc.

Adicionalmente, los antígenos tumorales también pueden abarcar antígenos idiotípicos asociados con una enfermedad cancerosa o tumoral, particularmente linfoma o una enfermedad asociada a linfoma, siendo tal antígeno idiotípico un idiotipo de inmunoglobulina de una célula de sangre linfocítica o un idiotipo de receptor de células T de una célula de sangre linfocítica.

Las proteínas antigénicas tumorales para el tratamiento de enfermedades cancerosas o tumorales son típicamente proteínas de origen mamífero, de manera preferente de origen humano. Su selección para el tratamiento de los sujetos depende del tipo del tumor que se trata y del perfil de expresión del tumor individual. Un ser humano que padece cáncer de próstata por ejemplo es tratado preferentemente con un antígeno tumoral que se expresa típicamente (o se sobreexpresa) en el carcinoma de próstata o se sobreexpresa específicamente en el sujeto que se trata, por ejemplo cualquiera de PSMA, PSCA, y/o PSA.

La región codificadora de los ácidos nucleicos como se definen aquí, en particular aquellos del kit o kit de partes de la invención, de acuerdo con el primer aspecto de la presente invención, pueden presentarse como un ácido nucleico mono-, di-, o multicistrónico, es decir un ácido nucleico que lleva las secuencias codificadoras de uno, dos o más proteínas o péptidos. Tales secuencias codificadoras en ácidos nucleicos di-, o aún multicistrónicos se pueden separar por al menos una secuencia de sitio de entrada de ribosoma interno (IRES), por ejemplo como se describe en la presente memoria o por los péptidos señal que inducen la escisión del polipéptido resultante que comprende varias proteínas y péptidos.

De acuerdo con la presente descripción, las secuencias de ácido nucleico como se definen aquí, en particular aquellos del kit o kit de partes de la invención, comprenden una región codificadora que codifica un péptido o proteína que comprende un antígeno tumoral o un fragmento, variante o derivado del mismo. De manera preferente, el antígeno tumoral codificado no es una proteína de histona. En el contexto de la presente invención tal proteína de histona es típicamente una proteína fuertemente alcalina encontrada en los núcleos de células eucarióticas que empaqueta y ordena el ADN en las unidades estructurales llamadas nucleosomas. Las proteínas de histona son los componentes de la proteína principal de cromatina, actúan como carretes alrededor de los cuales el ADN se enrolla y desempeñan una función en la regulación génica. Sin histonas, el ADN desenrollado en los cromosomas sería muy largo (una relación de longitud a ancho de más de 10 millones a uno en ADN humano). Por ejemplo, cada célula humana tiene aproximadamente 1,8 metros de ADN, pero enrollada en las histonas tiene aproximadamente 90 milímetros de cromatina que, cuando se duplica y se condensa durante la mitosis, da por resultado aproximadamente 120 micrómetros de cromosomas. De manera preferente, en el contexto de la presente invención tal proteína de histona se define típicamente como una proteína altamente conservada seleccionada de una de las siguientes cinco clases principales de histonas: H1/H5, H2A, H2B, H3, y H4", seleccionadas de manera preferente de histona de mamífero, de manera más preferente de histonas o proteínas de histona humanas. Tales histonas o proteínas de histona se organizan típicamente en dos súper clases definidas como histonas núcleo, que comprenden las histonas H2A, H2B, H3 y H4, e histonas conectoras, que comprenden las histonas H1 y H5.

En este contexto, las histonas conectoras preferentemente excluidas del alcance de la protección de la invención, de manera preferente histonas conectoras de mamífero, de manera más preferente histonas conectoras humanas, se seleccionan típicamente de H1, incluyendo H1F, incluyendo de manera particular H1F0, H1FNT, H1FOO, H1FX, y H1H1, incluyendo en particular HIST1H1A, HIST1H1B, HIST1H1C, HIST1H1D, HIST1H1E y HIST1H1T.

Adicionalmente, las histonas núcleo, excluidas de manera preferente del alcance de la protección de la invención, de manera preferente histonas núcleo de mamífero, de manera más preferente histonas núcleo humanas, se seleccionan típicamente de H2A, incluyendo H2AF, incluyendo de manera particular H2AFB1, H2AFB2, H2AFB3, H2AFJ, H2AFV, H2AFX, H2AFY, H2AFY2, H2AFZ, y H2A1, incluyendo de manera particular HIST1H2AA, HIST1H2AB, HIST1H2AC, HIST1H2AD, HIST1H2AE, HIST1H2AG, HIST1H2AI, HIST1H2AJ, HIST1H2AK, HIST1H2AL, HIST1H2AM, y H2A2, incluyendo de manera particular HIST2H2AA3, HIST2H2AC; H2B, incluyendo H2BF, incluyendo de manera particular H2BFM, H2BFO, H2BFS, H2BFWT H2B1, incluyendo de manera particular HIST1H2BA, HIST1H2BB, HIST1H2BC, HIST1H2BD, HIST1H2BE, HIST1H2BF, HIST1H2BG, HIST1H2BH, HIST1H2BI, HIST1H2BJ, HIST1H2BK, HIST1H2BL, HIST1H2BM, HIST1H2BN, HIST1H2BO, y H2B2, incluyendo de manera particular HIST2H2BE; H3, incluyendo H3A1, incluyendo de manera particular HIST1H3A, HIST1H3B, HIST1H3C, HIST1H3D, HIST1H3E, HIST1H3F, HIST1H3G, HIST1H3H, HIST1H3I, HIST1H3J, y H3A2, incluyendo de manera particular HIST2H3C, y H3A3, incluyendo de manera

particular HIST3H3; H4, incluyendo H41, incluyendo de manera particular HIST1H4A, HIST1H4B, HIST1H4C, HIST1H4D, HIST1H4E, HIST1H4F, HIST1H4G, HIST1H4H, HIST1H4I, HIST1H4J, HIST1H4K, HIST1H4L, y H44, incluyendo de manera particular HIST4H4, y H5.

5 De acuerdo con la presente descripción, las secuencias de ácido nucleico como se definen aquí, en particular aquellos del kit o kit de partes de la invención, comprenden una región codificadora que codifica un péptido o proteína que comprende un antígeno tumoral o un fragmento, variante o derivado del mismo. De manera preferente, el antígeno tumoral codificado no es una proteína reporter (por ejemplo Luciferasa, Proteína Fluorescente Verde (GFP), Proteína Fluorescente Verde Mejorada (EGFP), β-Galactosidasa) y no es una proteína marcadora o de selección (por ejemplo, alfa-Globina, Galactoquinasa y fosforibosil transferasa de Xantina:guanina (GPT)). De manera preferente, las secuencias de ácido
10 nucleico como se definen aquí, en particular aquellos del kit o kit de partes de la invención, no contienen un gen de resistencia a antibióticos (bacteriano), en particular no una secuencia de gen *neo* (gen de resistencia a Neomicina) o secuencia de gen CAT (cloranfenicol acetil transferasa, gen de resistencia a cloranfenicol).

Los ácidos nucleicos como se definen anteriormente, en particular aquellos del kit o kit de partes de la invención, comprenden o codifican, entre otras: a) una región codificadora que codifica un péptido o proteína que comprende un antígeno tumoral o un fragmento, variante o derivado del mismo; b) al menos un tallo-bucle de histona y c) una secuencia poli(A); preferentemente para incrementar la expresión de tal péptido o proteína codificada, donde el péptido o proteína codificada preferentemente no es una proteína de histona, ni una proteína reporter y/o ni una proteína marcadora o de selección, como se define anteriormente. Los elementos b) a c) de dichos ácidos nucleicos pueden presentarse en los ácidos nucleicos en cualquier orden, es decir los elementos a), b) y c) pueden presentarse en el orden a), b) y c) o a), c) y b) de la dirección 5' a 3' en la secuencia de ácido nucleico, donde el ácido nucleico además comprende o codifica para una secuencia poli(C) que comprende al menos 10 nucleótidos citidina. También pueden estar contenidos otros elementos adicionales como se describen aquí, como una estructura 5'-CAP, una secuencia poli(C), secuencias de estabilización, secuencias IRES, etc. Cada uno de los elementos a) a c) de los ácidos nucleicos como se definen aquí, en particular aquellos del kit o kit de partes de la invención, particularmente a) en constructos di- o multicistronicos y/o cada uno de los
20 elementos b) y c), de manera más preferente el elemento b) también se pueden repetir al menos una vez, de manera preferente dos o más veces, en dichos ácidos nucleicos. Como ejemplo, los ácidos nucleicos aquí descritos pueden comprender los elementos de secuencia a), b) y opcionalmente c) en, por ejemplo, el siguiente orden:

5' – región codificadora – tallo-bucle de histona – secuencia poli(A) – 3'; o

5' – región codificadora – tallo-bucle de histona – señal de poliadenilación – 3'; o

30 5' – región codificadora – secuencia poli(A) – tallo-bucle de histona – 3'; o

5' – región codificadora – señal de poliadenilación– tallo-bucle de histona – 3'; o

5' – región codificadora – región codificadora - tallo-bucle de histona – señal de poliadenilación - 3'; o

5' – región codificadora – tallo-bucle de histona – tallo-bucle de histona – secuencia de poli(A) – 3'; o

5' – región codificadora – tallo-bucle de histona – tallo-bucle de histona – señal de poliadenilación – 3'; etc.

35 En este contexto, es particularmente preferente que las secuencias de ácido nucleico como se definen aquí, en particular aquellos del kit o kit de partes de la invención, comprenden o codifican, entre otras: a) una región codificadora que codifica un péptido o proteína que comprende un antígeno tumoral o fragmento, variante o derivado del mismo; b) al menos un tallo-bucle de histona, y c) una secuencia poli(A); de manera preferente para incrementar el nivel de expresión de tal péptido o proteína codificada, donde la proteína codificada preferentemente no es una proteína de histona, ni proteína reporter (por ejemplo Luciferasa, GFP, EGFP, β-Galactosidasa, particularmente EGFP) y/o ni proteína marcadora o de selección (por ejemplo alfa-Globina, Galactoquinasa y fosforibosil transferasa Xantina:Guanina (GPT)).
40

En una realización preferida adicional del primer aspecto, las secuencias de ácido nucleico como se definen aquí, en particular aquellos del kit o kit de partes de la invención, también pueden presentarse en forma de ácidos nucleicos modificados.

45 En este contexto, las secuencias de ácido nucleico como se definen aquí, en particular aquellos del kit o kit de partes de la invención, se pueden modificar para proporcionar un “ácido nucleico estabilizado”, preferentemente un ARN estabilizado, de manera más preferente un ARN que es esencialmente resistente a la degradación *in vivo* (por ejemplo por una exo- o endonucleasa). Un ácido nucleico estabilizado puede obtenerse, por ejemplo, por modificación del contenido G/C de la región codificadora de la secuencia de ácido nucleico inventiva, por la introducción de análogos de nucleótidos (por ejemplo, nucleótidos con modificaciones de la cadena principal, modificaciones de azúcar o modificaciones base) o por la introducción de secuencias de estabilización en la región 3' y/o 5' no traducida de la secuencia de ácido nucleico inventiva.
50

Como se menciona anteriormente, las secuencias de ácido nucleico como se definen aquí pueden contener análogos/modificaciones de nucleótidos, por ejemplo modificaciones de cadena principal, modificaciones de azúcar o

modificaciones base. Una modificación de cadena principal en relación con la presente invención es una modificación en la cual los fosfatos del esqueleto de nucleótidos contenidos en las secuencias de dichos ácidos nucleicos como se definen aquí se modifican químicamente. Una modificación de azúcar en relación con la presente invención es una modificación química del azúcar de los nucleótidos de las secuencias de ácido nucleico como se definen aquí. Adicionalmente, una modificación de base en relación con la presente invención es una modificación química de la porción base de los nucleótidos de la molécula de ácido nucleico de las secuencias de ácido nucleico. En este contexto los análogos o modificaciones de nucleótidos se seleccionan preferentemente de análogos de nucleótidos que son aplicables para la transcripción y/o traducción.

En una realización preferida particular del primer aspecto de la presente invención, los análogos/modificaciones de nucleótidos aquí definidos se seleccionan de las modificaciones de base que incrementan adicionalmente la expresión de la proteína codificada y que se seleccionan preferentemente de 2-amino-6-cloropurinaribósido-5'-trifosfato, 2-aminoadenosin-5'-trifosfato, 2-tiocitidin-5'-trifosfato, 2-tiouridin-5'-trifosfato, 4-tiouridin-5'-trifosfato, 5-aminoallicitidin-5'-trifosfato, 5-aminoaliluridin-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-azauridin-5'-trifosfato, 6-cloropurinaribósido-5'-trifosfato, 7-desazaadenosin-5'-trifosfato, 7-desazaguanosin-5'-trifosfato, 8-azaadenosin-5'-trifosfato, 8-azidoadenosin-5'-trifosfato, bencimidazol-ribósido-5'-trifosfato, N1-metiladenosin-5'-trifosfato, N1-metilguanosin-5'-trifosfato, N6-metiladenosin-5'-trifosfato, 06-metilguanosin-5'-trifosfato, pseudouridin-5'-trifosfato, o puromicin-5'-trifosfato, xantosin-5'-trifosfato. Se da preferencia particular a nucleótidos para modificaciones de base seleccionados del grupo de nucleótidos con base modificada que consisten en 5-metilcitidin-5'-trifosfato, 7-desazaguanosin-5'-trifosfato, 5-bromocitidin-5'-trifosfato, y pseudouridin-5'-trifosfato.

De acuerdo con una realización adicional, las secuencias de ácido nucleico como se definen aquí, en particular aquellos del kit o kit de partes de la invención, pueden contener una modificación de lípidos. Tal ácido nucleico modificado con lípido comprende típicamente un ácido nucleico como se define aquí. Tal molécula de ácido nucleico modificada con lípido de dichas secuencias de ácido nucleico como se definen aquí comprende típicamente además al menos un conector unido covalentemente a esa molécula de ácido nucleico y al menos un lípido unido covalentemente al conector respectivo. Alternativamente, la molécula de ácido nucleico modificada con lípido comprende al menos una molécula de ácido nucleico como se define aquí y al menos un lípido (bifuncional) unido covalentemente (sin conector) a esa molécula de ácido nucleico. De acuerdo con una tercera alternativa, la molécula de ácido nucleico modificada con lípido comprende una molécula de ácido nucleico como se define aquí, al menos un conector unido covalentemente a esa molécula de ácido nucleico y al menos un lípido unido covalentemente al conector respectivo y también al menos un lípido (bifuncional) unido covalentemente (sin conector) a esa molécula de ácido nucleico. En este contexto se prefiere particularmente que la modificación de lípidos esté presente en los extremos terminales de una secuencia de ácido nucleico inventiva lineal.

De acuerdo con otra realización preferida del primer aspecto de la invención, las secuencias de ácido nucleico como se definen aquí, en particular aquellos del kit o kit de partes de la invención, particularmente si se proporcionan como ARN(m), puede por tanto estabilizarse frente a la degradación por las ARNasas por la adición de una llamada estructura "5'-CAP".

DE acuerdo con el primer aspecto de la invención, las secuencias de ácido nucleico como se definen aquí, en particular aquellos del kit o kit de partes de la invención, están modificadas con una secuencia de al menos 10 citidinas, de manera preferente al menos 20 citidinas, de manera más preferente al menos 30 citidinas (así llamada "secuencia poli(C)"). Particularmente, la secuencia de ácido nucleico inventiva puede contener o codificar una secuencia poli(C) de manera típica de aproximadamente 10 a 200 nucleótidos de citidina, de manera típica de aproximadamente 10 a 100 nucleótidos de citidina, de manera más preferente de aproximadamente 10 a 70 nucleótidos de citidina o aun de manera más preferente de aproximadamente 20 a 50 o aun 20 a 30 nucleótidos de citidina. Esta secuencia poli(C) se sitúa preferentemente en 3' de la región codificadora comprendida en dichos ácidos nucleicos, en particular aquellos del kit o kit de partes de la invención, de acuerdo con el primer aspecto de la presente invención.

El contenido G/C de la región codificadora que codifica al menos un péptido o proteína que comprende un antígeno tumoral o un fragmento, variante o derivado del mismo de la secuencia de ácido nucleico inventiva como se define aquí se modifica, particularmente se incrementa, comparado con el contenido G/C de su región codificadora de tipo salvaje particular, es decir, la región codificadora no modificada. La secuencia de aminoácidos codificada de la región codificadora preferentemente no se modifica en comparación con la secuencia de aminoácidos codificada de la región codificadora de tipo salvaje particular.

La modificación del contenido G/C de la región codificadora de las secuencias de ácido nucleico como se definen aquí, en particular aquellos del kit o kit de partes de la invención, se basa en el hecho de que la secuencia de cualquier región de ARNm que se traduce es importante para la traducción eficiente de ese ARNm. Así, la composición y la secuencia de los varios nucleótidos son importantes. En particular, las secuencias de ARNm que tienen un contenido de G (guanosina)/C (citosina) incrementado son más estables que las secuencias de ARNm que tienen un contenido de A (adenosina)/U (uracilo) incrementado. De acuerdo con la invención, los codones de la región codificadora por tanto varían en comparación con su región codificadora de tipo salvaje, mientras 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 uno y el mismo aminoácido (la llamada degeneración del código genético), se pueden determinar los codones

más favorables para la estabilidad (el llamado uso de codón alternativo).

Dependiendo del aminoácido que se codifica por la región codificadora de las secuencias de ácido nucleico como se definen aquí, en particular aquellos del kit o kit de partes de la invención, existen varias posibilidades para modificar la secuencia de ácido nucleico, por ejemplo la región codificadora, en comparación con su región codificadora de tipo salvaje.

5 En el caso de los aminoácidos que se codifican por los codones que contienen exclusivamente nucleótidos G o C, no es necesaria la codificación del codón. Así, los codones para Pro (CCC o CCG), Arg (CGC o CGG), Ala (GCC o GCG) y Gly (GGC o GGG) no requieren modificación, puesto que no está presente A o U.

En contraste, los codones que contienen los nucleótidos A y/o U se pueden modificar por sustitución de otros codones que codifican los mismos aminoácidos, pero no contienen A y/o U. Ejemplos de éstos son:

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

15 En otros casos, aunque los nucleótidos A o U no se pueden eliminar de los codones, sin embargo, es posible disminuir el contenido de A y U utilizando codones que contienen un contenido más bajo de nucleótidos A y/o U. Ejemplos de éstos son:

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

En el caso de los codones para Met (AUG) y Trp (UGG), por otra parte, no existe posibilidad de modificación de secuencia.

Las sustituciones arriba citadas se pueden utilizar ya sea individualmente o en todas las combinaciones posibles para incrementar el contenido de G/C de la región codificadora de la secuencia de ácido nucleico inventiva como se define aquí en comparación con su región codificadora de tipo salvaje particular (es decir la secuencia original). Así, por ejemplo, todos los codones para Thr que se presentan en la secuencia de tipo salvaje se pueden modificar a ACC (o ACG).

En el contexto anterior, se muestran los codones de ARNm. Por tanto, la uridina presente en un ARNm también puede estar presente como timidina en el ADN respectivo que codifica el ARNm particular.

40 Preferentemente, el contenido de G/C de la región codificadora de la secuencia de ácido nucleico inventiva como se define aquí se incrementa en al menos un 7%, de manera más preferente en al menos 15%, particularmente de manera más preferente en al menos 20%, comparado con el contenido de G/C de la región codificadora de tipo salvaje. De acuerdo con una realización específica al menos 5%, 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, de manera más preferente al menos 70 % , aún de manera más preferente al menos 80% y de manera mucho más preferente al menos 90%, 95% o aún 100% de los codones sustituibles en la región codificadora que codifica al menos un péptido o proteína que comprende un antígeno tumoral o un fragmento, variante o derivado del mismo se sustituyen, incrementando así el contenido de G/C de tal región codificadora.

En este contexto, es particularmente preferible incrementar el contenido de G/C de la región codificadora de las secuencias de ácido nucleico como se definen aquí, en particular aquellos del kit o kit de partes de la invención, al máximo (es decir 100% de los codones sustituibles), comparada con la región codificadora de tipo salvaje.

50 De acuerdo con la invención, una modificación preferida adicional de la región codificadora que codifica al menos un péptido o proteína que comprende un antígeno tumoral o un fragmento, variante o derivado del mismo de las secuencias de ácido nucleico como se definen aquí, en particular aquellos del kit o kit de partes de la invención, se basa en el descubrimiento de que la eficiencia de traducción también está determinada por una frecuencia diferente en la aparición de ARNt en las células. De esta manera, si los llamados "codones raros" están presentes en la región codificadora de dichas secuencias de ácido nucleico en un grado incrementado, la secuencia de ácido nucleico modificada

correspondiente se traduce en un grado significativamente menor que en caso de que estén presentes codones relativamente "frecuentes" que codifican los ARNt.

5 En este contexto, la región codificadora de las secuencias de ácido nucleico como se definen aquí, en particular aquellos del kit o kit de partes de la invención, preferentemente se modifica en comparación con la región codificadora de tipo salvaje correspondiente, de forma que al menos un codón de la secuencia de tipo salvaje que codifica un ARNt que es relativamente raro en las células se intercambia por un codón que codifica un ARNt que es relativamente frecuente en la célula y lleva el mismo aminoácido que el ARNt relativamente raro. Con esta modificación, la región codificadora de dichas secuencias de ácido nucleico se modifican de forma que se insertan los codones para los cuales los ARNt que se presentan frecuentemente están disponibles. En otras palabras, de acuerdo con la invención, mediante esta modificación
10 todos los codones de la región codificadora de tipo salvaje que codifican un ARNt que es relativamente raro en la célula puede en cualquier caso intercambiarse por un codón que codifica un ARNt que es relativamente frecuente en la célula y que, en cada caso, lleva el mismo aminoácido que el ARNt relativamente raro.

15 Los ARNt que se están presentes de manera relativamente frecuente en la célula y los que, en contraste, están presentes de manera relativamente rara son conocidos por el experto en la técnica; véase, por ejemplo, Akashi, Curr. Opin. Genet. Dev. 2001, 11(6): 660-666. Los codones que utilizan el aminoácido particular para el ARNt que se presenta más frecuentemente, por ejemplo el codón Gly que utiliza el ARNt que se presenta de manera más frecuente en la célula (humana), son particularmente preferentes.

20 De acuerdo con la invención, es particularmente preferente ligar el contenido de G/C secuencial que se incrementa, en particular se maximiza, en la región codificadora de la secuencia de ácido nucleico como se define aquí, en particular aquellos del kit o kit de partes inventivo, con los codones "frecuentes" sin modificar la secuencia de aminoácidos del péptido o proteína codificada por la región codificadora de dichas secuencias de ácido nucleico. Esta realización preferida permite la provisión de una secuencia de ácido nucleico eficientemente traducida y estabilizada (modificada) como se define aquí.

25 De acuerdo con otra realización preferida del primer aspecto de la invención, las secuencias de ácido nucleico como se definen aquí, en particular aquellas del kit o kit de partes de la invención, preferentemente tienen además al menos una secuencia de estabilización 5' y/o 3'. Estas secuencias de estabilización en las regiones no traducidas 5' y/o 3' tienen el efecto de incrementar la vida media del ácido nucleico, particularmente del ARNm, en el citosol. Estas secuencias de estabilización pueden tener un 100% de identidad de secuencia con las secuencias de origen natural que se presentan en los virus, bacterias y eucariotas, pero también pueden ser parcial o completamente sintéticas. Las secuencias no traducidas (UTR) del gen de (alfa-)globina, por ejemplo, de *Homo sapiens* o *Xenopus laevis* se pueden mencionar como ejemplo de secuencias de estabilización que se pueden utilizar en la presente invención para un ácido nucleico estabilizado. Otro ejemplo de secuencia de estabilización tiene la fórmula general (C/U)CCAN_xCCC(U/A)Py_xUC(C/U)CC, que está contenida en las 3'-UTR de los ARN muy estables que codifican (alfa-)globina, colágeno tipo(1), 15-lipoxigenasa o tirosina hidroxilasa (véase, Holcik et al. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 1997, 94: 2410 a 2414). Tales secuencias de estabilización por supuesto se pueden utilizar individualmente o en combinación entre sí y también en combinación con otras secuencias de estabilización conocidas por el experto en la técnica. En este contexto, se prefiere particularmente que la secuencia 3'-UTR del gen de alfa-globina se sitúe en 3' de la región codificadora que codifica al menos un péptido o proteína que comprende un antígeno tumoral o un fragmento, variante derivado del mismo comprendido en las secuencias de ácido nucleico como se definen aquí, en particular aquellas del kit o kit de partes de la invención, de acuerdo
40 con el primer aspecto de la presente invención.

45 Preferentemente, las sustituciones, adiciones o eliminaciones de las bases se llevan a cabo con las secuencias de ácido nucleico como se definen aquí, en particular aquellas del kit o kit de partes de la invención, utilizando una matriz de ADN para preparar la secuencia de ácido nucleico por técnicas de mutagénesis dirigida a sitio, bien conocidas, o con una estrategia de ligación de oligonucleótidos (véase por ejemplo Maniatis et al., Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press, 3ª ed., Cold Spring Harbor, NY, 2001).

50 Cualquiera de las modificaciones anteriores se puede aplicar a las secuencias de ácido nucleico como se definen aquí, en particular aquellas del kit o kit de partes de la invención, y además a cualquier ácido nucleico como se utiliza en el contexto de la presente invención y pueden, si es adecuado o necesario, combinarse entre sí en cualquier combinación, con la condición de que estas combinaciones de modificaciones no interfieran entre sí en el ácido nucleico respectivo. El experto en la técnica será capaz elegir en consecuencia.

Las secuencias de ácido nucleico como se definen aquí, en particular aquellas del kit o kit de partes de la invención, se pueden preparar utilizando cualquier método conocido en la técnica, incluyendo métodos sintéticos como síntesis de fase sólida, así como métodos *in vitro*, como reacciones de transcripción *in vitro* o reacciones *in vivo*, tales como propagación *in vivo* de plásmidos de ADN en bacterias.

55 En tales procesos, para preparar las secuencias de ácido nucleico como se definen aquí, en particular aquellas del kit o kit de partes de la invención, específicamente si el ácido nucleico está en forma de un ARNm, una molécula de ADN correspondiente se puede transcribir *in vitro*. Esta matriz de ADN comprende preferentemente un promotor adecuado, por ejemplo un promotor T7 o SP6, para la transcripción *in vitro*, que es seguida por la secuencia de nucleótidos deseada

para la molécula de ácido nucleico, por ejemplo ARNm, que se va a preparar y una señal de terminación para la transcripción *in vitro*. La molécula de ADN que forma la matriz de al menos un ARN de interés se puede preparar por proliferación fermentativa y aislamiento subsecuente como parte de un plásmido que se puede replicar en bacterias. Los plásmidos que se pueden mencionar como adecuados para la presente invención son por ejemplo los plásmidos pT7T (número de acceso de GenBank U26404; Lai et al. Development 1995, 121: 2349 a 2360), serie pGEM®, por ejemplo, pGEM®-1 (número de acceso de GenBank X65300; de Promega) y pSP64 (número de acceso de GenBank X65327); véase también, Mezei y Storts, Purification of PCR Products, en: Griffin y Griffin (ed.), PCR Technology: Current Innovation, CRC Press, Boca Raton, FL, 2001.

Las secuencias de ácido nucleico como se definen aquí, así como proteínas o péptidos como son codificados por dichas secuencias de ácido nucleico, pueden comprender fragmentos o variantes de aquellas secuencias. Tales fragmentos o variantes pueden comprender típicamente una secuencia que tiene una identidad de secuencia con uno de los ácidos nucleicos mencionados anteriormente, o con una de las proteínas o péptidos o secuencias, si se codifican por la secuencia de ácido nucleico inventiva, de al menos un 5%, 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, de manera preferente al menos 70%, de manera más preferente al menos 80%, igualmente de manera más preferible al menos 85%, aun de manera más preferible al menos 90% y de manera mucho más preferible al menos 95% o aún 97%, 98% o 99%, con la secuencia de tipo salvaje completa, ya sea a nivel de ácido nucleico o a nivel de aminoácido.

Los "fragmentos" de proteínas o péptidos en el contexto de la presente invención (por ejemplo como se codifican por las secuencias de ácido nucleico como se definen aquí, en particular aquellas del kit o kit de partes de la invención) pueden comprender una secuencia de una proteína o péptido como se define aquí que está, con respecto a su secuencia de aminoácidos (o su molécula de ácido nucleico codificada), N-terminalmente, C-terminalmente y/o intrasecuencialmente truncada/acortada comparada con la secuencia de aminoácidos de la proteína original (nativa) (o su molécula de ácido nucleico codificada). Tal truncamiento puede presentarse así ya sea a nivel de aminoácido o correspondientemente a nivel de ácido nucleico. Una identidad de secuencia con respecto a tal fragmento como se define aquí puede así referirse preferentemente a la proteína o al péptido completo como se define aquí o a la molécula de ácido nucleico completa (codificadora) de tal proteína o péptido. Del mismo modo, los "fragmentos" de ácidos nucleicos en el contexto de la presente descripción pueden comprender una secuencia de un ácido nucleico como se define aquí que está, con respecto a su molécula de ácido nucleico 5', 3'- y/o intrasecuencialmente, truncada/acortada comparada con la molécula de ácido nucleico de la molécula de ácido nucleico original (nativa). Una identidad de secuencia con respecto a tal fragmento como se define aquí puede así referirse preferiblemente al ácido nucleico completo como se define aquí y el nivel de identidad de secuencia preferido típicamente es como se indica aquí. Los fragmentos tienen la misma función biológica o actividad específica o al menos retienen una actividad de la proteína de longitud completa natural de al menos 50%, de manera más preferible al menos 70%, aun de manera más preferible al menos 90% (medida en un ensayo funcional apropiado, por ejemplo un ensayo que evalúa la propiedad antigénica por un sistema de ensayo apropiado que por ejemplo mide una reacción inmunológica, por ejemplo expresión y/o secreción de una citoquina apropiada (como un indicador de la reacción inmune) comparado con el péptido o proteína nativa de longitud completa, por ejemplo su propiedad antigénica o terapéutica específica. Por consiguiente, en una realización preferida, el "fragmento" es una porción de la proteína antigénica tumoral de longitud completa (de origen natural) que ejerce propiedades antigénicas tumorales en el sistema inmunitario como se indica aquí.

Los fragmentos de proteínas o péptidos en el contexto de la presente invención (por ejemplo como es codificado por las secuencias de ácido nucleico como se definen aquí, en particular aquellas del kit o kit de partes de la invención) pueden comprender adicionalmente una secuencia de una proteína o péptido como se define aquí que tiene una longitud de aproximadamente 6 a aproximadamente 20 o aún más aminoácidos, por ejemplo fragmentos como es procesado y presentado por las moléculas clase I MHC, preferiblemente con una longitud de aproximadamente 8 a aproximadamente 10 aminoácidos, por ejemplo 8, 9, o 10, (o aun 6, 7, 11, o 12 aminoácidos), o fragmentos como es procesado o presentado por las moléculas clase II MHC, preferiblemente con una longitud de aproximadamente 13 o más aminoácidos, por ejemplo 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20 o aún más aminoácidos, pudiendo seleccionarse estos fragmentos de cualquier parte de la secuencia de aminoácidos. Estos fragmentos son reconocidos típicamente por las células T en forma de un complejo que consiste en el fragmento de péptido y una molécula MHC, es decir los fragmentos no se reconocen típicamente en su forma nativa. Los fragmentos de proteínas o péptidos como se definen aquí pueden comprender al menos un epítipo de estas proteínas o péptidos. Adicionalmente, también los dominios de una proteína, como el dominio extracelular, el dominio intracelular o el dominio transmembrana y se entiende que las versiones acortadas o truncadas de una proteína comprenden un fragmento de una proteína.

Los fragmentos de proteínas o péptidos como se definen aquí (por ejemplo, como se codifica por la secuencia de ácido nucleico inventiva como se define aquí) también pueden comprender epítipos de estas proteínas o péptidos. Los epítipos de células T o partes de las proteínas en el contexto de la presente invención pueden comprender fragmentos que preferiblemente tienen una longitud de aproximadamente 6 a aproximadamente 20 o aún más aminoácidos, por ejemplo fragmentos como es procesado y presentado por las moléculas clase I MHC preferentemente con una longitud de aproximadamente 8 a aproximadamente 10 aminoácidos, por ejemplo 8, 9, o 10, (o aun 11, o 12 aminoácidos), o fragmentos como es procesado y presentado por las moléculas clase II MHC preferentemente con una longitud de aproximadamente 13 o más aminoácidos, por ejemplo 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20 o aún más aminoácidos, pudiendo seleccionarse estos fragmentos de cualquier parte de la secuencia de aminoácidos. Estos fragmentos se reconocen

típicamente por las células T en forma de un complejo que consiste en un fragmento de péptido y una molécula MHC, es decir los fragmentos no se reconocen típicamente en su forma nativa.

5 Los epítomos de células B son típicamente fragmentos situados sobre la superficie exterior de los antígenos de proteína o péptido (nativos) como se definen aquí, preferiblemente con 5 a 15 aminoácidos, de manera más preferible con 5 a 12 aminoácidos, aun de manera más preferible con 6 a 9 aminoácidos, que se pueden reconocer por los anticuerpos, es decir en su forma nativa.

10 Tales epítomos de proteínas o péptidos se pueden seleccionar además de cualquiera de las variantes mencionadas aquí de tales proteínas o péptidos. En este contexto, los determinantes antigénicos pueden ser epítomos conformacionales o discontinuos que se componen de segmentos de las proteínas o péptidos como se definen aquí, que son discontinuos en la secuencia de aminoácidos de las proteínas o péptidos como se definen aquí, pero que se juntan en la estructura tridimensional, o epítomos continuos o lineales que se componen de una sola cadena de polipéptido.

15 Las "variantes" de proteínas o péptidos como se definen en el contexto de la presente descripción pueden estar codificadas por la secuencia de ácido nucleico como se define aquí. Así, se puede generar una proteína o péptido que tiene una secuencia de aminoácidos que difiere de la secuencia original en una o más (2, 3, 4, 5, 6, 7 o más) mutación o mutaciones, tal como uno o más aminoácido(s) sustituido, insertado y/o deleciónado. El nivel preferido de identidad de secuencia de las "variantes" en vista de la secuencia de proteína natural de longitud completa es como se indica típicamente aquí. De manera preferente, las variantes tienen la misma función biológica o actividad específica o al menos retienen una actividad de la proteína de longitud completa natural de al menos 50%, de manera más preferente al menos 70%, aun de manera más preferente al menos 90% (medido en un ensayo funcional apropiado, por ejemplo por un ensayo que evalúa la reacción inmunológica hacia el antígeno tumoral por la secreción y/o expresión de una o más citoquinas) comparado con el péptido o proteína nativa de longitud completa, por ejemplo su propiedad antigénica específica. Por consiguiente, en una realización aquí descrita, la "variante" es una variante de una proteína antigénica tumoral que ejerce propiedades antigénicas tumorales hasta el grado como se indica en la presente memoria.

25 Las "variantes" de proteínas o péptidos como se definen en el contexto de la presente descripción (por ejemplo, como se codifica por un ácido nucleico como se define aquí) pueden comprender sustitución o sustituciones de aminoácidos conservativas comparado con su secuencia nativa, es decir fisiológica no mutada. Esas secuencias de aminoácidos, así como sus secuencias de nucleótidos codificadoras en particular se agrupan bajo el término variantes como se define aquí. Las sustituciones en los cuales los aminoácidos, que se originan de la misma clase, se intercambian entre sí se llaman sustituciones conservativas. En particular, estos son aminoácidos que tienen cadenas laterales alifáticas, cadenas laterales cargadas positiva o negativamente, grupos aromáticos en las cadenas laterales o aminoácidos, las cadenas laterales de los cuales pueden formar puentes de hidrógeno, por ejemplo cadenas laterales que tienen una función hidroxilo. Esto significa que, por ejemplo, un aminoácido que tiene una cadena lateral polar se reemplaza por otro aminoácido que tiene también una cadena lateral polar, o, por ejemplo, un aminoácido caracterizado por una cadena lateral hidrofóbica se sustituye por otro aminoácido que tiene una cadena lateral también hidrofóbica (por ejemplo, serina (treonina) por treonina (serina) o leucina (isoleucina) por isoleucina (leucina)). Las inserciones y sustituciones son posibles, en particular, en aquellas posiciones de secuencia que no causan ninguna modificación en la estructura tridimensional o no afectan la región de unión. Las modificaciones en una estructura tridimensional por inserción o inserciones o deleción o deleciones se pueden determinar fácilmente, por ejemplo utilizando un espectro CD (espectro de dicroísmo circular) (Urry, 1985, Absorption, Circular Dichroism and ORD of Polypeptides, en: Modern Physical Methods in Biochemistry, Neuberger et al. (ed.), Elsevier, Ámsterdam).

45 Además, las variantes de proteínas o péptidos como se definen aquí que se pueden codificar por la secuencia de ácido nucleico como se define aquí, en particular aquella del kit o kit de partes de la invención, también pueden comprender aquellas secuencias donde los nucleótidos del ácido nucleico se intercambian de acuerdo con la degeneración del código genético, sin conducir a una alteración de la secuencia de aminoácidos respectiva de la proteína o péptido, es decir la secuencia de aminoácidos o al menos parte de la misma no puede diferir de la secuencia original en una o más mutaciones dentro del significado anterior.

50 Con el fin de determinar el porcentaje al cual las dos secuencias son idénticas, por ejemplo las secuencias de ácido nucleico o secuencias de aminoácidos como se definen aquí, preferentemente las secuencias de aminoácidos codificadas por las secuencias de ácido nucleico como se definen aquí, en particular aquellas del kit o kit de partes de la invención, o las mismas secuencias de aminoácidos, las secuencias se pueden alinear con el fin de ser comparadas subsecuentemente entre sí. Por tanto, por ejemplo, una posición de una primera secuencia se puede comparar con la posición correspondiente de la segunda secuencia. Si una posición en la primera secuencia está ocupada por el mismo componente como es el caso en una posición en la segunda secuencia, las dos secuencias son idénticas en esta posición. Si este no es el caso, las secuencias difieren en esta posición. Si hay inserciones en la segunda secuencia en comparación con la primera secuencia, se pueden insertar huecos en la primera secuencia para permitir una alineación adicional. Si hay deleciones en la segunda secuencia en comparación con la primera secuencia, se pueden insertar huecos en la segunda secuencia para permitir una alineación adicional. El porcentaje al cual las dos secuencias son idénticas es entonces función del número de posiciones idénticas dividido entre el número total de posiciones, incluyendo aquellas posiciones que están ocupadas solo en una secuencia. El porcentaje al cual dos secuencias son idénticas se puede

determinar utilizando un algoritmo matemático. Un ejemplo preferido pero no limitativo de un algoritmo matemático que se puede utilizar es el algoritmo de Karlin et al. (1993), PNAS USA, 90:5873-5877 o Altschul et al. (1997), Nucleic Acids Res., 25:3389-3402. Tal algoritmo se integra en el programa BLAST. Las secuencias que son idénticas a las secuencias de la presente invención en un cierto grado pueden ser identificadas con este programa.

- 5 Las secuencias de ácido nucleico como se definen aquí pueden codificar derivados de un péptido o proteína. Tal derivado de un péptido o proteína es una molécula que se deriva de otra molécula, tal como tal péptido o proteína. Un "derivado" contiene típicamente la secuencia de longitud completa del péptido o proteína natural y características de secuencia adicionales, por ejemplo en el extremo N o C, que pueden mostrar una función adicional al péptido/proteína de longitud completa natural. Nuevamente, tales derivados tienen la misma función biológica o actividad específica o al menos
- 10 retienen una actividad de la proteína de longitud completa natural de al menos 50%, de manera más preferente al menos 70%, aun de manera más preferente al menos 90% (medida en un ensayo funcional apropiado, véase anteriormente, por ejemplo como se indica por la expresión y/o secreción de citoquinas en una reacción inmunológica) comparada con el péptido o proteína nativa de longitud completa, por ejemplo su propiedad terapéutica específica. Así, un "derivado" de un péptido o proteína también abarca péptidos/proteínas de fusión (quiméricas) que comprenden un péptido o proteína
- 15 utilizada en la presente descripción o una proteína de longitud completa natural (o variante/fragmento de la misma) fusionada con un péptido/proteína distinta que confiere por ejemplo dos o más funciones biológicas al péptido/proteína de fusión. Por ejemplo, la fusión comprende una etiqueta, por ejemplo un epítipo, por ejemplo un epítipo FLAG o un epítipo V5 o un epítipo HA. Por ejemplo, el epítipo es un epítipo FLAG. Tal etiqueta es útil para, por ejemplo, purificar la proteína de fusión.
- 20 En este contexto, una "variante" de una proteína o péptido puede tener al menos un 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 98% o 99% de identidad de aminoácidos con respecto a un tramo de 10, 20, 30, 50, 75 o 100 aminoácidos de tal proteína o péptido. De manera análoga, una "variante" de una secuencia de ácido nucleico, o particularmente, un fragmento, puede tener al menos un 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 98% o 99% de identidad de nucleótidos con respecto a un tramo de 10, 20, 30, 50, 75 o 100 nucleótidos de tal secuencia de ácido nucleico; típicamente, sin embargo, con respecto a las
- 25 secuencias de longitud completa de origen natural. En caso de "fragmentos" típicamente, la identidad de secuencia se determina para el fragmento respecto a la longitud (del fragmento) en la porción de la proteína de longitud completa (que refleja la misma longitud que el fragmento), que muestra el nivel más alto de identidad de secuencia.

En una realización preferida adicional del primer aspecto de la presente invención, las secuencias de ácido nucleico como se definen aquí, en particular aquellas del kit o kit de partes de la invención, están asociadas a un vehículo, agente de

30 transfección o de formación de complejos para incrementar la eficiencia de transfección y/o las propiedades inmunoestimuladoras de la secuencia de ácido nucleico inventiva. Agentes adecuados particularmente preferidos en este contexto para incrementar la eficiencia de la transfección son compuestos catiónicos o policatiónicos, incluyendo protamina, nucleolina, espermina o espermidina, u otros péptidos o proteínas catiónicas, tales como poli-L-lisina (PLL), poli-arginina, polipéptidos básicos, péptidos penetrantes de células (CPP), incluyendo péptidos de unión a VIH, VIH-1 Tat (VIH), péptidos derivados de Tat, Penetratina, péptidos derivados de VP22 o análogos, HSV VP22 (Herpes simple), MAP, KALA o dominios de transducción de proteínas (PTD), PpT620, péptidos ricos en prolina, péptidos ricos en arginina, péptidos ricos en lisina, MPG-péptido(s), Pep-1, L-oligómeros, péptido(s) de calcitonina, péptidos derivados de Antennapedia (particularmente de *Drosophila antennapedia*), pAntp, plsl, FGF, Lactoferrina, Transportano, Buforina-2, Bac715-24, SynB, SynB(1), pVEC, péptidos derivados de hCT, SAP, o histonas. Adicionalmente, las proteínas o péptidos

35 catiónicos o policatiónicos preferidos se pueden seleccionar de las siguientes proteínas o péptidos de la siguiente fórmula completa: (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 pueden ser cualquier número seleccionado de 0, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14 o 15, con la condición de que el contenido total de Arg, Lys, His y Orn represente al menos el 50% de todos los aminoácidos del oligopéptido; y Xaa puede ser cualquier aminoácido seleccionado de aminoácidos nativos (= de origen natural) o no nativos excepto Arg, Lys, His u Orn; y x puede ser cualquier número seleccionado de 0, 1, 2, 3 o 4, con la condición de que el contenido total de Xaa no exceda el 50% de todos los aminoácidos del oligopéptido. Son péptidos catiónicos particularmente preferidos en este contexto por ejemplo Arg₇, Arg₈, Arg₉, H₃R₉, R₉H₃, H₃R₉H₃, YSSR₉SSY, (RKH)₄, Y(RKH)₂R, etc. Los compuestos catiónicos o policatiónicos preferidos adicionales que se pueden utilizar como agente de transfección pueden incluir polisacáridos catiónicos, por ejemplo quitosano, polibreno, polímeros catiónicos, por ejemplo polietilenimina (PEI), lípidos catiónicos, por ejemplo DOTMA: cloruro de [1-(2,3-sioleiloxi)propil]-N,N,N-trimetilamonio, DMRIE, di-C14-amidina, DOTIM, SAINT, DC-Chol, BGTC, CTAP, DOPC, DODAP, DOPE: Dioleil-fosfatidiletanol-amina, DOSPA, DODAB, DOIC, DMEPC, DOGS: Dioctadecilamidoglicilespermina, DIMRI: bromuro de Dimiristo-oxipropil-dimetil-hidroxietil-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-hidroxietil)]-dimetilamonio, CLIP6: rac-[2(2,3-dihexadeciloxipropil-oximetiloxi)etil]-trimetilamonio, CLIP9: rac-[2(2,3-dihexadeciloxipropil-oxisuccinilox)etil]-trimetilamonio, oligofectamina, o

40 polímeros catiónicos o policatiónicos, por ejemplo poliaminoácidos modificados, tales como β-aminoácido-polímeros o poliamidas inversas, etc., polietilenos modificados, tal como PVP bromuro de (poli(N-etil-4-vinilpiridinio)), etc., acrilatos modificados, tal como pDMAEMA (metacrilato de poli(dimetilaminoetil)), etc., amidoaminas modificadas tal como pAMAM (poli(amidoamina)), etc., polibetaaminoéster modificado (PBAE), tal como polímeros de 1,4 butanodiol diacrilato-co-5-amino-1-pentanol modificados con extremo de diamina, etc., dendrímeros, tal como dendrímeros de polipropilamina o dendrímeros basados en pAMAM, etc., poliimina(s), tal como PEI: poli(etilenimina), poli(propilenimina), etc., polialilamina, polímeros basados en cadena principal de azúcar, como polímeros basados en ciclodextrina, polímeros basados en

55

60

dextrano, quitosano, etc., polímeros basados en cadena principal de silano, tales como copolímeros de PMOXA-PDMS, etc., polímeros en bloque que consisten en una combinación de uno o más bloques catiónicos (por ejemplo seleccionados de un polímero catiónico como se menciona anteriormente) y de uno o más bloques hidrofílicos o hidrofóbicos (por ejemplo polietilenglicol); etc.

- 5 En este contexto se prefiere particularmente que los ácidos nucleicos como se definen aquí, en particular aquellos del kit o kit de partes de la invención, estén complejados al menos parcialmente con un compuesto catiónico o policatiónico, de manera preferente proteínas o péptidos catiónicos. Parcialmente significa que solo una parte de dichos ácidos nucleicos está complejada con un compuesto catiónico o policatiónico y el resto de dichos ácidos nucleicos no está complejado ("libre"). De manera preferente, la relación ácido nucleico complejado:ácido nucleico libre se selecciona de un intervalo de aproximadamente 5:1 (p/p) a aproximadamente 1:10 (p/p), de manera más preferente de un intervalo de aproximadamente 4:1 (p/p) a aproximadamente 1:8 (p/p), aun de manera más preferente de un intervalo de aproximadamente 3:1 (p/p) a aproximadamente 1:5 (p/p) o 1:3 (p/p), y de manera mucho más preferente la relación ácido nucleico complejado:ácido nucleico libre se selecciona de una relación de aproximadamente 1:1 (p/p).

- 10 Se prefiere que las secuencias de ácido nucleico como se definen aquí, en particular aquellas del kit o kit de partes de la invención, se proporcionen en cualquier forma desnuda o complejada, por ejemplo con compuestos policatiónicos de cualquier estructura química, de manera preferente (poli)péptidos policatiónicos o compuestos policatiónicos sintéticos. De manera preferente, dichas secuencias de ácido nucleico no se proporcionan conjuntamente con una célula de empaquetamiento.

- 15 En otro aspecto, la presente invención proporciona una composición o kit o kit de partes que comprende al menos un tipo de secuencia de ácido nucleico según la presente invención.

- 20 En un aspecto adicional, la invención proporciona una composición que comprende una las secuencias de ácido nucleico como se definen aquí con respecto al kit o kit de partes. Estas composiciones inventivas comprenden así más de una secuencia de ácido nucleico como se definen aquí, que codifican diferentes péptidos o proteínas que comprenden diferentes antígenos tumorales o fragmentos, variantes o derivados de los mismos, como se define aquí con respecto al kit o kit de partes.

- 25 La composición de la invención que comprende una pluralidad (que significa típicamente más de 1, 2, 3, 4, 5, 6 o más de 10 ácidos nucleicos, por ejemplo de 2 a 10, de manera preferente de 2 a 5 ácidos nucleicos) de secuencias de ácido nucleico como se definen aquí, particularmente para el uso en el tratamiento de cáncer de pulmón de células no pequeñas (NSCLC), comprende al menos:

- 30 a) una secuencia de ácido nucleico que comprende o que codifica
- i. una región codificadora, que codifica al menos un péptido o proteína que comprende el antígeno tumoral NY-ESO-1, o un fragmento, variante o derivado del mismo,
 - ii. al menos un tallo-bucle de histona, y
 - iii. una secuencia poli(A) o una señal de poliadenilación;
- 35 b) un ácido nucleico inventivo que codifica al menos un péptido o proteína, donde tal péptido o proteína codificada comprende el antígeno tumoral 5T4 o un fragmento, variante o derivado del mismo; y
- c) un ácido nucleico inventivo que codifica al menos un péptido o proteína, donde tal péptido o proteína codificada comprende el antígeno tumoral survivina o un fragmento, variante o derivado del mismo.
- 40 d) un ácido nucleico inventivo que codifica al menos un péptido o proteína, donde tal péptido o proteína codificada comprende el antígeno tumoral MAGE-C1 o un fragmento, variante o derivado del mismo; y
- e) un ácido nucleico inventivo que codifica al menos un péptido o proteína, donde tal péptido o proteína codificada comprende el antígeno tumoral MAGE-C2 o un fragmento, variante o derivado del mismo,

donde el fragmento de NY-ESO-1, 5T4, survivina, MAGE-C1 o MAGE-C2 tiene una longitud de al menos seis residuos aminoácidos; donde cada secuencia de ácido nucleico A, B, C, D o E - en la dirección 5' a 3' - comprende o codifica para

- 45 i)
- a) la región codificante,
 - b) al menos un tallo-bucle de histona, y
 - c) una secuencia poli(A);

o

ii)

- a) la región codificante,
- b) una secuencia poli(A), y
- c) al menos un tallo-bucle de histona;

5 donde el al menos un tallo-bucle de histona en i) o ii) se selecciona de las fórmulas (I) o (II) como se definen aquí;
donde

tallo 1 y tallo 2 son capaces de un emparejamiento de bases uno con el otro

forman una secuencia inversa complementaria, pudiendo suceder el apareamiento de bases entre tallo 1 y tallo 2 o

10 forman parcialmente una secuencia inversa complementaria, pudiendo suceder un apareamiento de bases incompleto entre tallo 1 y tallo 2 y

donde cada ácido nucleico A, B, C, D o E comprende o codifica además para una secuencia poli(C) que comprende al menos 10 nucleótidos citidina.

De acuerdo con un aspecto adicional, la presente invención también proporciona un método *in vitro* para incrementar la expresión de un péptido o proteína codificada que comprende las etapas, por ejemplo, a) proporcionar el kit o kit de partes de la invención o la composición de la invención, b) aplicar o administrar el kit o kit de partes de la invención o la composición de la invención que comprende una pluralidad de secuencias de ácido nucleico como se definen aquí a un sistema de expresión, por ejemplo a un sistema de expresión libre de células, una célula (por ejemplo una célula huésped de expresión o una célula somática), un tejido o un organismo. El método se puede aplicar para laboratorio, para investigación, para diagnóstico, para la producción comercial de péptidos o proteínas y/o con propósitos terapéuticos. En este contexto, típicamente después de preparar el kit o kit de partes de la invención como se define aquí o la composición de la invención que comprende una pluralidad de secuencias de ácido nucleico como se definen aquí, se aplica o se administra típicamente a un sistema de expresión libre de células, a una célula (por ejemplo una célula huésped de expresión o una célula somática), a un tejido u organismo, por ejemplo en forma desnuda o formando un complejo o como una composición farmacéutica o vacuna como se describe aquí, preferentemente por transfección o empleando cualquiera de los modos de administración que se describen aquí. El método se lleva a cabo *in vitro*. El método se puede llevar a cabo además en el contexto del tratamiento de una enfermedad específica, particularmente en el tratamiento de enfermedades cancerosas o tumorales, de manera preferente como se definen aquí.

En este contexto, "*in vitro*" se define aquí como transfección o transducción de los ácidos nucleicos del kit o kit de partes inventivo como se define aquí o de la composición inventiva que comprende una pluralidad de secuencias de ácido nucleico como se definen aquí en células en cultivo fuera de un organismo; "*in vivo*" se define aquí como transfección o transducción de los ácidos nucleicos del kit o kit de partes inventivo o de la composición inventiva que comprende una pluralidad de secuencias de ácido nucleico como se definen aquí en las células por la aplicación de dichos ácidos nucleicos o de dicha composición al organismo completo o al individuo y "*ex vivo*" se define aquí como transfección o transducción de los ácidos nucleicos del kit o kit de partes inventivo o de la composición inventiva que comprende una pluralidad de secuencias de ácido nucleico como se definen aquí (que significa típicamente más de 1, 2, 3, 4, 5, 6 o más de 10 ácidos nucleicos, por ejemplo de 2 a 10, de manera preferente de 2 a 5 ácidos nucleicos) en las células fuera de un organismo o individuo y la aplicación subsecuente de las células transfectadas al organismo o individuo.

Del mismo modo, de acuerdo con otro aspecto, la presente invención también proporciona el uso del kit o kit de partes como se define aquí o de la composición inventiva que comprende una pluralidad de secuencias de ácido nucleico como se definen aquí, preferentemente con propósitos diagnósticos o terapéuticos, para incrementar la expresión de un péptido o proteína codificada *in vitro*, por ejemplo aplicando o administrando el kit o el kit de partes inventivo como se define aquí o la composición inventiva que comprende una pluralidad de secuencias de ácido nucleico como se definen aquí, por ejemplo, a un sistema de expresión libre de células, a una célula (por ejemplo una célula huésped de expresión o una célula somática), a un tejido u organismo. El uso se puede aplicar para laboratorio, investigación, para diagnóstico, para la producción comercial de péptidos a proteínas y/o con propósitos terapéuticos. En este contexto, típicamente después de preparar las secuencias de ácido nucleico del kit o kit de partes inventivo como se definen aquí o de la composición inventiva que comprende una pluralidad de secuencias de ácido nucleico como se definen aquí, se aplican o se administran típicamente a un sistema de expresión libre de células, a una célula (por ejemplo una célula huésped de expresión o una célula somática), a un tejido u organismo, preferentemente en forma desnuda o en forma complejada, o como una composición o vacuna farmacéutica como se describe aquí, preferentemente mediante transfección o empleando cualquiera de los modos de administración que se describen aquí. El uso se lleva a cabo *in vitro*. El uso se puede llevar a cabo adicionalmente en el contexto del tratamiento de una enfermedad específica, particularmente en el tratamiento de enfermedades cancerosas o tumorales, de manera preferente como se describe en la presente memoria.

También está previsto aquí un sistema de expresión que comprende las secuencias de ácido nucleico como se definen

aquí o un vector o plásmido de expresión como se define aquí. En este contexto, el sistema de expresión puede ser un sistema de expresión libre de células (por ejemplo un sistema de transcripción/traducción *in vitro*), un sistema de expresión celular (por ejemplo células de mamífero como células CHO, células de insecto, células de levadura, células bacterianas como *E. coli*) u organismos utilizados para la expresión de péptidos o proteínas (por ejemplo plantas o animales como vacas).

Adicionalmente, los ácidos nucleicos como se definen aquí, en particular aquellos del kit o kit de partes de la invención, la composición inventiva que comprende una pluralidad de secuencias de ácido nucleico como se definen aquí se pueden emplear para la preparación de una composición farmacéutica para incrementar la expresión de un péptido o proteína codificada, por ejemplo para tratar una enfermedad cancerosa o tumoral, preferentemente como se define aquí, por ejemplo aplicando o administrando los ácidos nucleicos como se definen aquí, en particular aquellos del kit o kit de partes de la invención, o la composición inventiva que comprende una pluralidad de secuencias de ácido nucleico inventivas como se definen aquí a una célula (por ejemplo una célula huésped de expresión o una célula somática), a un tejido u organismo, preferentemente en forma desnuda o en forma complejada o como una composición farmacéutica o vacuna como se describe aquí, de manera más preferente utilizando cualquiera de los modos de administración que describen en la presente memoria.

Por consiguiente, en un aspecto preferido particular, la presente invención también proporciona una composición farmacéutica que comprende un kit o kit de partes inventivo o una composición inventiva que comprende una pluralidad de secuencias de ácido nucleico como se definen aquí y opcionalmente un portador y/o vehículo farmacéuticamente aceptable.

Como un primer ingrediente, la composición farmacéutica inventiva comprende los ácidos nucleicos como se definen aquí con respecto al kit o kit de partes.

Como un segundo ingrediente, la composición farmacéutica inventiva puede comprender opcionalmente al menos un componente farmacéuticamente activo adicional. Un componente farmacéuticamente activo a este respecto es un compuesto que tiene un efecto terapéutico para curar, mejorar o prevenir una indicación o enfermedad particular como se menciona aquí, preferentemente enfermedades cancerosas o tumorales. Tales compuestos incluyen, sin implicar ninguna limitación, péptidos o proteínas, preferentemente como se definen aquí, ácidos nucleicos, preferentemente como se definen aquí, compuestos orgánicos o inorgánicos de peso bajo molecular (terapéuticamente activos) (peso molecular inferior a 5.000, de manera preferente inferior a 1.000), azúcares, antígenos o anticuerpos, preferentemente como se define aquí, agentes terapéuticos ya conocidos en la técnica previa, células antigénicas, fragmentos celulares antigénicos, fracciones celulares, componentes de pared celular (por ejemplo polisacáridos), patógenos (virus, bacterias, etc.) modificados, atenuados o desactivados (por ejemplo químicamente o por irradiación), adyuvantes, preferentemente como se definen aquí, etc.

Adicionalmente, la composición farmacéutica inventiva puede comprender un portador y/o vehículo farmacéuticamente aceptable. En el contexto de la presente invención, un portador farmacéuticamente aceptable incluye típicamente la base líquida o no líquida de la composición farmacéuticamente inventiva. Si la composición farmacéuticamente inventiva se proporciona en forma líquida, el portador será típicamente agua libre de pirógenos, solución salina isotónica o soluciones tamponadas (acuosas), por ejemplo soluciones tamponadas con fosfato, citrato o etc. El tampón de inyección puede ser hipertónico, isotónico o hipotónico con referencia al medio de referencia específico, es decir, la solución tampón puede tener un contenido en sal más alto, idéntico o más bajo que el medio de referencia específico, donde preferentemente pueden emplearse concentraciones de las sales mencionadas anteriormente que no conducen al daño celular por ósmosis u otros efectos de la concentración. Los medios de referencia son por ejemplo líquidos que se presentan en los métodos "*in vivo*", tales como sangre, líquidos linfáticos, citosólicos u otros líquidos corporales, o por ejemplo líquidos que se pueden utilizar como medios de referencia en los métodos "*in vitro*", tal como tampones o líquidos comunes. Tales tampones o líquidos comunes son conocidos por el experto. La solución de Ringer-Lactato es particularmente preferente como base líquida.

Sin embargo, también se pueden utilizar uno o más materiales de carga o diluyentes sólidos o líquidos compatibles o compuestos encapsuladores para la composición farmacéutica inventiva, que son adecuados para la administración a un paciente que se trata. El término "compatible" como se utiliza aquí significa que estos constituyentes de la composición farmacéutica inventiva son capaces de mezclarse con los ácidos nucleicos como se definen aquí de manera que no existe interacción que reduzca esencialmente la efectividad farmacéutica de la composición farmacéuticamente inventiva bajo las condiciones de uso típicas.

De acuerdo con una realización específica, la composición farmacéutica inventiva puede comprender un adyuvante. En este contexto, un adyuvante puede entenderse como cualquier compuesto adecuado para iniciar o incrementar una respuesta inmunitaria en el sistema inmunitario innato, es decir una respuesta inmunitaria no específica. En otras palabras, cuando se administra, la composición farmacéutica inventiva preferentemente induce una repuesta inmunitaria innata debido al adyuvante opcionalmente contenido en la misma. De manera preferente, tal adyuvante se puede seleccionar de un adyuvante conocido por el experto y adecuado para el presente caso, es decir que soporta la inducción de una respuesta inmunitaria innata en un mamífero, por ejemplo una proteína adyuvante como se define anteriormente o un adyuvante como se define a continuación.

Particularmente preferidos como adyuvantes adecuados para depósito y administración son los compuestos catiónicos o policatiónicos como se definen anteriormente para la secuencia de ácido nucleico inventiva como vehículo, agente de transfección o formador de complejos.

5 La composición farmacéutica inventiva puede contener adicionalmente una o más sustancias auxiliares con el fin de incrementar su inmunogenicidad o capacidad inmunoestimuladora, si se desea. Una acción sinérgica de las secuencias de ácido nucleico como se definen aquí y de una sustancia auxiliar, que puede estar contenida opcionalmente en la composición farmacéutica inventiva, se logra preferentemente de esta manera. Dependiendo de los diversos tipos de sustancias auxiliares, varios mecanismos pueden entrar en consideración en este aspecto. Por ejemplo, los compuestos que permiten la maduración de las células dendríticas (DC), por ejemplo lipopolisacáridos, TNF-alfa o ligando CD40, forman una primera clase de sustancias auxiliares adecuadas. En general, es posible utilizar como sustancia auxiliar cualquier agente que influya en el sistema inmunitario en la manera de una "señal peligrosa" (LPS, GP96, etc.) o citoquinas, tales como GM-CSF, que permiten que una respuesta inmunitaria se potencie y/o influya de forma dirigida. Sustancias auxiliares particularmente preferidas son citoquinas, como monoquinas, linfocinas, interleuquinas o quimioquinas, que promueven adicionalmente la respuesta inmunitaria innata, como IL-1, IL-2, IL-3, IL-4, IL-5, IL-6, IL-7, IL-8, IL-9, IL-10, IL-12, IL-13, IL-14, IL-15, IL-16, IL-17, IL-18, IL-19, IL-20, IL-21, IL-22, IL-23, IL-24, IL-25, IL-26, IL-27, IL-28, IL-29, IL-30, IL-31, IL-32, IL-33, IFN-alfa, IFN-beta, IFN-gamma, GM-CSF, G-CSF, M-CSF, LT-beta o TNF-alfa, factores de crecimiento, tales como hGH.

20 Otros aditivos que se pueden incluir en la composición farmacéutica inventiva son emulsificantes, por ejemplo Tween®; agentes humectantes, por ejemplo laurilsulfato de sodio; agentes colorantes; agentes saborizantes, portadores farmacéuticos; agentes formadores de comprimidos; estabilizantes; antioxidantes; conservantes.

La composición farmacéutica inventiva también puede contener cualquier compuesto adicional que se sabe que es inmunoestimulador debido a su afinidad de unión (como ligando) a los receptores similares a Toll humanos TLR1, TLR2, TLR3, TLR4, TLR5, TLR6, TLR7, TLR8, TLR9, TLR10, o debido a su afinidad de unión (como ligandos) a los receptores similares a Toll murinos TLR1, TLR2, TLR3, TLR4, TLR5, TLR6, TLR7, TLR8, TLR9, TLR10, TLR11, TLR12 o TLR13.

25 La composición farmacéutica inventiva se puede administrar vía oral, parenteral, por pulverización de inhalación, vía tópica, rectal, nasal, bucal, vaginal o mediante un depósito implantado. El término parenteral como se utiliza aquí incluye inyección subcutánea, intravenosa, intramuscular, intraarticular, intrasinovial, intraesternal, intratecal, intrahepática, intralesional, intracraneal, transdérmica, intradérmica, intrapulmonar, intraperitoneal, intracardiaca, intraarterial y sublingual o técnicas de infusión.

30 Preferentemente, la composición farmacéutica inventiva se puede administrar por inyección parenteral, es especial por inyección subcutánea, intravenosa, intramuscular, intraarticular, intrasinovial, intraesternal, intratecal, intrahepática, intralesional, intracraneal, transdérmica, intradérmica, intrapulmonar, intraperitoneal, intracardiaca, intraarterial y sublingual o por técnicas de infusión. Se prefiere en particular la inyección intradérmica e intramuscular. Las formas inyectables estériles de las composiciones farmacéuticas inventivas pueden estar como suspensión acuosa u oleosa. Estas suspensiones se pueden formular de acuerdo con técnicas conocidas en el campo utilizando agentes de dispersión o humectación adecuados y agentes de suspensión.

La composición farmacéutica inventiva como se define aquí también se puede administrar vía oral en cualquier forma de dosificación oralmente aceptable incluyendo, pero no limitado a, cápsulas, comprimidos, suspensiones o soluciones acuosas.

40 La composición farmacéutica inventiva también se puede administrar vía tópica, especialmente cuando el objetivo del tratamiento incluye áreas u órganos fácilmente accesibles para la aplicación tópica, por ejemplo incluyendo enfermedades de la piel o cualquier otro tejido epitelial accesible. Las formulaciones tópicas adecuadas se preparan fácilmente para cada una de estas áreas u órganos. Para las aplicaciones tópicas, la formulación farmacéutica inventiva se puede formular en un ungüento adecuado que contiene el ácido nucleico inventivo como se define aquí suspendido o disuelto en uno o más portadores.

45 La composición farmacéutica inventiva comprende típicamente una "cantidad segura y efectiva" de los componentes de la composición farmacéutica inventiva, particularmente de la o las secuencias de ácido nucleico como se definen aquí. Como se utiliza aquí, una "cantidad segura y efectiva" significa una cantidad de la o las secuencias de ácido nucleico como se definen aquí que como tal es suficiente para inducir una modificación positiva de una enfermedad o trastorno como se define aquí. Al mismo tiempo, sin embargo, una "cantidad segura y efectiva" es lo suficientemente pequeña como para evitar efectos secundarios serios y para permitir una relación sensible entre la ventaja y riesgo. La determinación de estos límites está típicamente dentro del alcance del juicio médico sensible.

La composición farmacéutica inventiva se puede utilizar con propósitos médicos humanos y también veterinarios, preferentemente con propósitos médicos humanos, como composición farmacéutica en general o como vacuna.

55 De acuerdo con otro aspecto particularmente preferido, la composición farmacéutica inventiva (o el kit o kit de partes como se define aquí o la composición inventiva que comprende una pluralidad de secuencias de ácido nucleico como se definen

aquí) se puede proporcionar o utilizar como vacuna. Típicamente, tal vacuna es como se define anteriormente para composiciones farmacéuticas. Adicionalmente, tal vacuna contiene típicamente los ácidos nucleicos como se definen aquí con respecto al kit o kit de partes o la composición inventiva que comprende una pluralidad de secuencias de ácido nucleico como se definen en la presente memoria.

- 5 La vacuna inventiva también puede comprender un portador, adyuvante y/o vehículo farmacéuticamente aceptable como se define aquí para la composición farmacéutica inventiva. En el contexto específico de la vacuna inventiva, la selección de un portador farmacéuticamente aceptable viene determinada en principio por la manera en la cual la vacuna inventiva se administra. La vacuna inventiva se puede administrar por ejemplo sistémica o localmente. Las vías para la administración sistémica incluyen en general, por ejemplo, las vías transdérmica, oral, parenteral, incluyendo inyecciones subcutáneas, intravenosas intramusculares, intraarteriales, intradérmicas e intraperitoneales y/o vías de administración intranasal. Las vías para la administración local incluyen en general, por ejemplo, vías de administración tópica pero también inyecciones intradérmicas, transdérmicas, subcutáneas o intramusculares o inyecciones intralesionales, intracraneales, intrapulmonares, intracardíacas y sublinguales. De manera más preferente, las vacunas se pueden administrar vía intradérmica, subcutánea o intramuscular. Así, las vacunas inventivas se formulan preferentemente en forma líquida (o algunas veces sólida).

La vacuna inventiva puede contener adicionalmente una o más sustancias auxiliares con el fin de incrementar su inmunogenicidad o capacidad inmunoestimuladora, si se desea. Particularmente preferidos son los adyuvantes como sustancias auxiliares o aditivos como se definen para la composición farmacéutica.

- 20 La presente invención proporciona además varias aplicaciones y usos del kit o kit de partes como se define aquí, de la composición inventiva que comprende una pluralidad de secuencias de ácido nucleico como se definen aquí, de la composición farmacéutica inventiva, de la vacuna inventiva, todas comprendiendo las secuencias de ácido nucleico como se definen con respecto al kit o kit de partes.

- 25 De acuerdo con un aspecto específico, la presente invención se dirige al primer uso médico del kit o kit de partes inventivo como se define aquí o de la composición inventiva que comprende una pluralidad de secuencias de ácido nucleico como se definen aquí como un medicamento, preferentemente como una vacuna, en particular en el tratamiento de enfermedades cancerosas o tumorales.

Además, la presente invención se refiere a un kit o kit de partes que comprende:

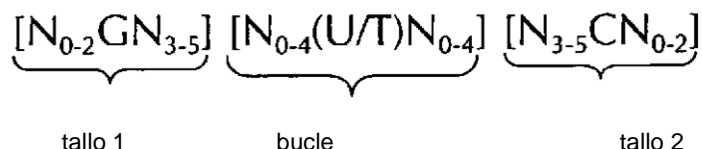
- A) un ácido nucleico que comprende o codifica para una región codificante, donde la región codificante codifica al menos un péptido o proteína, que comprende el antígeno tumoral NY-ESO-1 o un fragmento del mismo;
- 30 B) un ácido nucleico que comprende o codifica para una región codificante, donde la región codificante codifica al menos un péptido o proteína, que comprende el antígeno tumoral 5T4 o un fragmento del mismo;
- C) un ácido nucleico que comprende o codifica para una región codificante, donde la región codificante codifica al menos un péptido o proteína, que comprende el antígeno tumoral survivina o un fragmento del mismo;
- 35 D) un ácido nucleico que comprende o codifica para una región codificante, donde la región codificante codifica al menos un péptido o proteína, que comprende el antígeno tumoral MAGE-C1 o un fragmento del mismo;
- E) un ácido nucleico que comprende o codifica para una región codificante, donde la región codificante codifica al menos un péptido o proteína, que comprende el antígeno tumoral MAGE-C2 o un fragmento del mismo;

donde el fragmento de NY-ESO-1, 5T4, survivina, MAGE-C1 o MAGE-C2 tiene una longitud de al menos seis residuos aminoácidos; donde cada secuencia de ácido nucleico A, B, C, D o E, en la dirección 5' a 3', comprende o codifica para

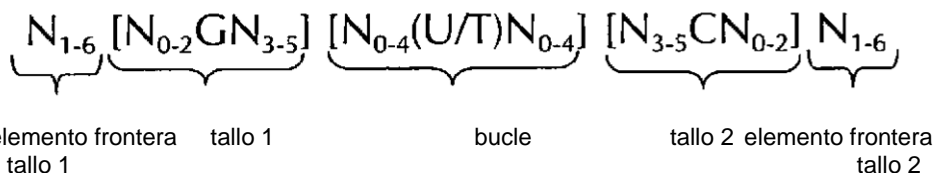
- 40 i) a) la región codificante
b) al menos un tallo-bucle de histona, y
c) una secuencia poli(A);
o
ii) a) la región codificadora
45 b) una secuencia poli(A); y
c) al menos un tallo-bucle de histona;

donde el al menos un tallo-bucle de histona en i) o ii) se selecciona de las fórmulas (I) o (II)

fórmula (I) (secuencia tallo-bucle sin elementos frontera de tallo):



fórmula (II) (secuencia de tallo-bucle con elementos frontera de tallo):



5

donde:

10 los elementos frontera N_{1-6} de tallo 1 o tallo 2 son una secuencia consecutiva de 1 a 6, de manera preferente de 2 a 6, de manera más preferente de 2 a 5, aún de manera más preferente de 3 a 5, de manera mucho más preferente de 4 a 5 o 5 N, donde cada N se selecciona independientemente de un nucleótido seleccionado de A, U, T, G y C, o un análogo de nucleótido del mismo;

15 tallo 1 $[N_{0-2}GN_{3-5}]$ es una complementariedad inversa o complementariedad parcialmente inversa con el elemento tallo 2, y es una secuencia consecutiva de entre 5 a 7 nucleótidos; donde N_{0-2} es una secuencia consecutiva de 0 a 2, de manera preferente de 0 a 1, de manera más preferente de 1 N, en donde cada N se selecciona independientemente de un nucleótido seleccionado de A, U, T, G y C o un análogo de nucleótido del mismo; donde N_{3-5} es una secuencia consecutiva de 3 a 5, de manera preferente de 4 a 5, de manera más preferente de 4 N, en donde cada N se selecciona independientemente de otro de un nucleótido seleccionado de A, U, T, G y C o un análogo de nucleótido del mismo, y donde G es guanosina o un análogo de la misma, y se puede reemplazar opcionalmente por una citidina o un análogo de la misma, con la condición de que su citidina de nucleótido complementaria en el tallo 2 se reemplace por guanosina;

20 la secuencia de bucle $[N_{0-4}(U/T)N_{0-4}]$ se sitúa entre los elementos tallo 1 y tallo 2, y es una secuencia consecutiva de 3 a 5 nucleótidos, de manera más preferente de 4 nucleótidos; donde cada N_{0-4} es independientemente una secuencia consecutiva de 0 a 4, de manera preferente de 1 a 3, de manera más preferente de 1 a 2 N, en donde cada N se selecciona independientemente de otro de un nucleótido seleccionado de A, U, T, G y C o un análogo de nucleótido del mismo; y donde U/T representa uridina, u opcionalmente timidina;

25 tallo 2 $[N_{3-5}CN_{0-2}]$ es complementariedad inversa o complementariedad parcialmente inversa con el elemento tallo 1 y es una secuencia consecutiva entre 5 a 7 nucleótidos; donde N_{3-5} es una secuencia consecutiva de 3 a 5, de manera preferente de 4 a 5, de manera más preferente de 4 N, en donde cada N se selecciona independientemente de un nucleótido seleccionado de A, U, T, G y C o un análogo de nucleótido del mismo; donde N_{0-2} es una secuencia consecutiva de 0 a 2, de manera preferente de 0 a 1, de manera más preferente de 1 N, en donde cada N se selecciona independientemente de un nucleótido seleccionado de A, U, T, G o C o un análogo de nucleótido del mismo; y donde C es citidina o un análogo de la misma, y se puede reemplazar opcionalmente por una guanosina o un análogo de la misma con la condición de que su guanosina de nucleótido complementaria en el tallo 1 se reemplace por citidina;

donde

35 tallo 1 y tallo 2 son capaces de un emparejamiento de bases entre sí formando una secuencia complementaria inversa, donde el emparejamiento de bases puede presentarse entre el tallo 1 y tallo 2, o formando una secuencia complementaria parcialmente inversa, donde un emparejamiento de bases incompleto puede presentarse entre tallo 1 y tallo 2, o

o a la composición como se describe aquí para su uso como un medicamento.

40 De acuerdo con otro aspecto, la presente invención se dirige al segundo uso médico del kit o kit de partes como se define aquí o de la composición inventiva que comprende una pluralidad de secuencias de ácido nucleico como se definen aquí, para el tratamiento de enfermedades cancerosas o tumorales como se definen aquí, preferentemente para el uso del kit o kit de partes como se define aquí, de la composición inventiva que comprende una pluralidad de secuencias de ácido nucleico inventivas como se definen aquí, de una composición farmacéutica o vacuna que las comprenden como se define aquí para la preparación de un medicamento para la profilaxis, tratamiento y/o mejora de enfermedades cancerosas o tumorales como se definen aquí. Preferentemente, la composición farmacéutica o vacuna se utiliza para ser administrada a un paciente en necesidad de la misma para este propósito.

45

Preferentemente, las enfermedades como se mencionan aquí se seleccionan de enfermedades cancerosas o tumorales

que preferentemente incluyen por ejemplo leucemia linfoblástica aguda, leucemia mieloide aguda, carcinoma adrenocortical, cánceres relacionados con SIDA, linfoma relacionados con SIDA, cáncer anal, cáncer del apéndice, Astrocitoma, Carcinoma de células basales, Cáncer de conducto biliar, Cáncer de vejiga, Cáncer óseo, Osteosarcoma/Histiocitoma fibroso maligno, Glioma del tronco encefálico, Tumor cerebral, Astrocitoma cerebelar, 5 astrocitoma cerebelar/glioma maligno, ependimoma, meduloblastoma, tumores neuroectodérmicos primitivos supratentoriales, rutas visuales y glioma hipotalámico, Cáncer de mama, Adenomas bronquiales/carcinoides, linfoma de Burkitt, Tumor carcinoide infantil, Tumor carcinoide gastrointestinal, Carcinoma primario desconocido, Linfoma del sistema nervioso central primario, astrocitoma cerebelar infantil, astrocitoma Cerebelar infantil/Glioma maligno, Cáncer cervical, cánceres infantiles, Leucemia linfocítica crónica, Leucemia mielógena crónica, Trastornos mieloproliferativos crónicos, 10 Cáncer de colon, Linfoma de células T cutáneo, Tumor de células redondas pequeñas desmoplásicas, Cáncer del endometrio, Ependimoma, Cáncer de esófago, sarcoma de Ewing en la familia de tumores de Ewing, Tumor de células germinales extracraneales infantiles, Tumor de células germinales Extragonadal, Cáncer del conducto biliar extrahepático, Melanoma intraocular, Retinoblastoma, Cáncer de la vesícula biliar, Cáncer gástrico (Estómago), Tumor Carcinoide Gastrointestinal, Tumor estromal gastrointestinal (GIST), tumor de células germinales extracraneal, extragonadal, o de ovario, tumor trofoblástico gestacional, Glioma del tallo cerebral, Astrocitoma Cerebral Infantil, Ruta Visual Infantil y Glioma Hipotalámico, carcinoide gástrico, leucemia de células pilosas, cáncer de cuello y cabeza, Cáncer de corazón, Cáncer Hepatocelular (hígado), linfoma de Hodgkin, Cáncer de la hipofaringe, glioma de la ruta hipotalámica y visual infantil, melanoma intraocular, carcinoma de células de los islotes (Páncreas Endocrino), sarcoma de Kaposi, cáncer de riñón (cáncer de células renales), Cáncer de la Laringe, Leucemias, Leucemia linfoblástica aguda, leucemia linfoblástica aguda, 20 leucemia mieloide aguda, leucemia linfocítica crónica, leucemia mielógena crónica, leucemia de células pilosas, cáncer de labio y la cavidad oral, liposarcoma, cáncer de hígado, Cáncer de Pulmón de Células no pequeñas, Cáncer de pulmón de células pequeñas, linfomas, Linfoma asociado con SIDA, Linfoma de Burkitt, Linfoma de Células T Cutáneas, Linfoma de Hodgkin, Linfomas no de Hodgkin, Linfoma del Sistema Nervioso Central primario, microglobulinemia de Waldenström, Histiocitoma Fibroso Maligno de Hueso/Osteosarcoma, Meduloblastoma Infantil, Melanoma, Melanoma Intraocular (Ojo), 25 Carcinoma de células de Merkel, Mesotelioma maligno adulto, Mesotelioma Infantil, Cáncer de cuello escamoso metastásico con Cáncer de Boca, Primario, Oculto, síndrome de neoplasia endocrina Múltiple Infantil, Mieloma múltiple/neoplasma de células de plasma, Micosis Fungoides, Síndromes Mielodisplásicos, Enfermedades Mielodisplásicas/Mieloproliferativas, Leucemia Mielógena Crónica, Leucemia Mieloide Aguda Adulta, Leucemia Mieloide Aguda Infantil, Mieloma Múltiple (Cáncer de la Médula Ósea), Trastornos Mieloproliferativos crónicos, cáncer de la cavidad nasal y seno paranasal, carcinoma de Nasofaringe, Neuroblastoma, Cáncer Oral, Cáncer de Orofaringe, Osteosarcoma/histiocitoma fibroso maligno de huesos, cáncer de ovario, cáncer epitelial de ovario (tumor epitelial-estromal superficial), tumor de células germinales de ovario, tumor potencial maligno bajo de ovario, cáncer pancreático, cáncer pancreático de células de los islotes, cáncer de seno paranasal y cavidad oral, cáncer de Paratiroides, Cáncer de pene, Cáncer de la faringe, Feocromocitoma, Astrocitoma Pineal, Germinoma Pineal, Pineoblastoma Infantil y tumores 35 neuroectodérmicos primitivos supratentoriales, Adenoma de la pituitaria, neoplasia de células de plasma/Mieloma Múltiple, Blastoma pleuropulmonar, Linfoma del sistema nervioso central primario, Cáncer de Próstata, Cáncer rectal, Carcinoma de células renales (cáncer de riñón), Cáncer del a pelvis Renal y uretra, Retinoblastoma, Rbdomiosarcoma infantil, Cáncer de la glándula salival, Sarcoma de la familia de tumor de Ewing, Sarcoma de Kaposi, Sarcoma de tejido blando, Sarcoma uterino, Síndrome de Sézary, Cáncer de piel (no melanoma), Cáncer de piel (melanoma), Carcinoma de piel de células de Merkel, Cáncer del intestino delgado, carcinoma de células escamosas, Cáncer de cuello escamoso metastásico con tumor neuroectodérmico primitivo supratentorial infantil primario oculto, Cáncer Testicular, Cáncer de garganta, Timoma infantil, Timoma y carcinoma tímico, Cáncer de tiroides, cáncer de tiroides infantil, Cáncer de células transicionales de la pelvis renal y uréter, tumor trofoblástico gestacional, Cáncer de uretra, Cáncer Uterino endometrial, Sarcoma uterino, Cáncer Vaginal, Ruta visual infantil y glioma hipotalámico, Cáncer Vulvar, macroglobulinemia de 45 Waldenström, y tumor de Wilms infantil (cáncer de riñón).

Además, la invención proporciona un kit o kit de partes que comprende:

- A) un ácido nucleico que comprende o codifica para una región codificante, donde la región codificante codifica al menos un péptido o proteína, que comprende el antígeno tumoral NY-ESO-1 o un fragmento del mismo;
- B) un ácido nucleico que comprende o codifica para una región codificante, donde la región codificante codifica al menos 50 un péptido o proteína, que comprende el antígeno tumoral 5T4 o un fragmento del mismo;
- C) un ácido nucleico que comprende o codifica para una región codificante, donde la región codificante codifica al menos un péptido o proteína, que comprende el antígeno tumoral survivina o un fragmento del mismo;
- D) un ácido nucleico que comprende o codifica para una región codificante, donde la región codificante codifica al menos un péptido o proteína, que comprende el antígeno tumoral MAGE-C1 o un fragmento del mismo;
- 55 E) un ácido nucleico que comprende o codifica para una región codificante, donde la región codificante codifica al menos un péptido o proteína, que comprende el antígeno tumoral MAGE-C2 o un fragmento del mismo;

donde el fragmento de NY-ESO-1, 5T4, survivina, MAGE-C1 o MAGE-C2 tiene una longitud de al menos seis residuos aminoácidos; donde cada secuencia de ácido nucleico A, B, C, D o E, en la dirección 5' a 3', comprende o codifica para

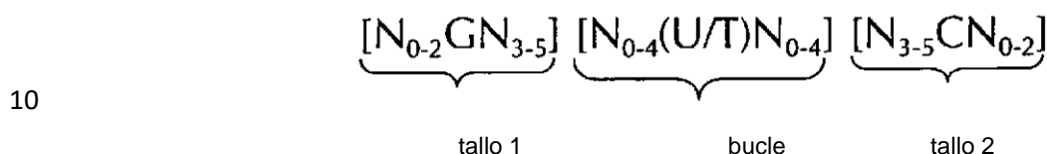
- i) a) la región codificante
 b) al menos un tallo-bucle de histona, y
 c) una secuencia poli(A);

o

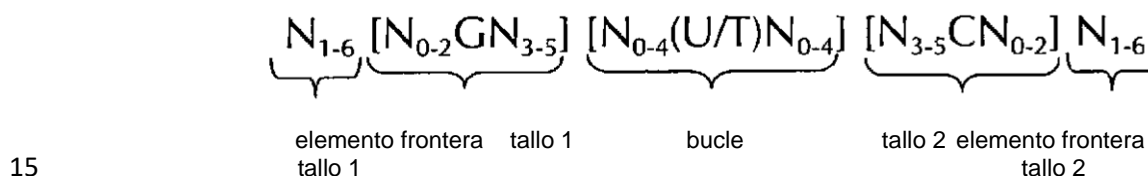
- 5 ii) a) la región codificadora
 b) una secuencia poli(A); y
 c) al menos un tallo-bucle de histona;

donde el al menos un tallo-bucle de histona en i) o ii) se selecciona de las fórmulas (I) o (II)

fórmula (I) (secuencia tallo-bucle sin elementos frontera de tallo):



fórmula (II) (secuencia de tallo-bucle con elementos frontera de tallo):



donde:

- 20 los elementos frontera N_{1-6} de tallo 1 o tallo 2 son una secuencia consecutiva de 1 a 6, de manera preferente de 2 a 6, de manera más preferente de 2 a 5, aún de manera más preferente de 3 a 5, de manera mucho más preferente de 4 a 5 o 5 N, donde cada N se selecciona independientemente de un nucleótido seleccionado de A, U, T, G y C, o un análogo de nucleótido del mismo;

- 25 tallo 1 $[N_{0-2}GN_{3-5}]$ es una complementariedad inversa o complementariedad parcialmente inversa con el elemento tallo 2, y es una secuencia consecutiva de entre 5 a 7 nucleótidos; donde N_{0-2} es una secuencia consecutiva de 0 a 2, de manera preferente de 0 a 1, de manera más preferente de 1 N, en donde cada N se selecciona independientemente de un nucleótido seleccionado de A, U, T, G y C o un análogo de nucleótido del mismo; donde N_{3-5} es una secuencia consecutiva de 3 a 5, de manera preferente de 4 a 5, de manera más preferente de 4 N, en donde cada N se selecciona independientemente de otro de un nucleótido seleccionado de A, U, T, G y C o un análogo de nucleótido del mismo, y donde G es guanosina o un análogo de la misma, y se puede reemplazar opcionalmente por una citidina o un análogo de la misma, con la condición de que su citidina de nucleótido complementaria en el tallo 2 se reemplace por guanosina;

- 30 la secuencia de bucle $[N_{0-4}(U/T)N_{0-4}]$ se sitúa entre los elementos tallo 1 y tallo 2, y es una secuencia consecutiva de 3 a 5 nucleótidos, de manera más preferente de 4 nucleótidos; donde cada N_{0-4} es independientemente una secuencia consecutiva de 0 a 4, de manera preferente de 1 a 3, de manera más preferente de 1 a 2 N, en donde cada N se selecciona independientemente de otro de un nucleótido seleccionado de A, U, T, G y C o un análogo de nucleótido del mismo; y donde U/T representa uridina, u opcionalmente timidina;

- 35 tallo 2 $[N_{3-5}CN_{0-2}]$ es complementariedad inversa o complementariedad parcialmente inversa con el elemento tallo 1 y es una secuencia consecutiva entre 5 a 7 nucleótidos; donde N_{3-5} es una secuencia consecutiva de 3 a 5, de manera preferente de 4 a 5, de manera más preferente de 4 N, en donde cada N se selecciona independientemente de un nucleótido seleccionado de A, U, T, G y C o un análogo de nucleótido del mismo; donde N_{0-2} es una secuencia consecutiva de 0 a 2, de manera preferente de 0 a 1, de manera más preferente de 1 N, en donde cada N se selecciona independientemente de un nucleótido seleccionado de A, U, T, G o C o un análogo de nucleótido del mismo; y donde C es citidina o un análogo de la misma, y se puede reemplazar opcionalmente por una guanosina o un análogo de la misma con la condición de que su guanosina de nucleótido complementaria en el tallo 1 se reemplace por citidina;

donde

tallo 1 y tallo 2 son capaces de un emparejamiento de bases entre sí formando una secuencia complementaria inversa, donde el emparejamiento de bases puede presentarse entre el tallo 1 y tallo 2, o formando una secuencia complementaria parcialmente inversa, donde un emparejamiento de bases incompleto puede presentarse entre tallo 1 y tallo 2, o

o una composición como se define aquí para su uso en el tratamiento de enfermedades cancerosas o tumorales.

- 5 En un aspecto preferido adicional, el kit o kit de partes como se define aquí o la composición inventiva que comprende una pluralidad de secuencias de ácido nucleico como se definen aquí se puede utilizar para la preparación de una composición farmacéutica o una vacuna, particularmente para los propósitos aquí definidos.

La composición farmacéutica inventiva o vacuna se puede utilizar adicionalmente para el tratamiento de una enfermedad o un trastorno, preferentemente de enfermedades cancerosas o tumorales como se definen aquí.

- 10 Los kits de la invención, particularmente kits de partes, típicamente pueden comprender, como componentes solos o en combinación con componentes adicionales como se definen aquí, como tales las secuencias de ácido nucleico como se definen aquí, la composición farmacéutica inventiva o la vacuna que comprende las secuencias de ácido nucleico como se definen aquí. Las secuencias de ácido nucleico como se definen aquí están opcionalmente en combinación con componentes adicionales como se definen aquí, de forma que los ácidos nucleicos se proporcionan separadamente
- 15 (primera parte del kit) de al menos una parte del kit que comprende uno o más de otros componentes. La composición farmacéutica inventiva y/o la vacuna inventiva por ejemplo pueden presentarse en una o diferentes partes del kit. Ilustrativamente, por ejemplo, al menos una parte del kit puede comprender al menos una secuencia de ácido nucleico como se define aquí y al menos una parte adicional del kit al menos otro componente como se define aquí, al menos otra parte del kit puede comprender al menos una composición farmacéutica o vacuna o una parte de la misma, por ejemplo
- 20 al menos una parte del kit puede comprender una secuencia de ácido nucleico como se define aquí, al menos una parte adicional del kit al menos otro componente como se define aquí, al menos una parte adicional del kit al menos un componente de la composición farmacéutica inventiva o vacuna o la composición farmacéutica inventiva o vacuna en conjunto y al menos una parte adicional del kit por ejemplo al menos un portador o vehículo farmacéutico, etc. Dado que el kit o kit de partes comprende una pluralidad de secuencias de ácido nucleico, un componente del kit puede comprender
- 25 solo una, varias o todas las secuencias de ácido nucleico comprendidas en el kit. En una realización alternativa, cada secuencia de ácido nucleico puede estar comprendida en un componente diferente/separado del kit, de forma que cada componente forma una parte del kit. También, más de un ácido nucleico puede estar comprendido en un primer componente como una parte del kit, mientras que uno o más de otros componentes (segundos, terceros, etc.) (que proporciona una o más de otras partes del kit) pueden contener ya sea uno o más de uno de los ácidos nucleicos inventivos, que pueden ser idénticos o parcialmente idénticos o diferentes del primer componente. El kit o kit de partes puede contener adicionalmente instrucciones técnicas con información sobre la administración y dosificación de la secuencia de ácido nucleico inventiva, la composición farmacéutica inventiva o la vacuna inventiva o de cualquiera de sus componentes o partes, por ejemplo si el kit se prepara como un kit de partes.
- 30

- 35 La composición puede comprender además un portador farmacéuticamente aceptable y/o adyuvantes farmacéuticamente aceptables como se definen aquí. La composición se puede utilizar como vacuna o para el tratamiento de una enfermedad asociada con cáncer o tumores.

En otros aspectos, la invención se refiere a un ácido nucleico seleccionado del grupo consistente en la SEQ ID NO: 57 y SEQ ID NO: 58 y a una composición farmacéutica que comprende ácido nucleico dicho. El ácido nucleico y la composición farmacéutica están previstos para su uso en el tratamiento del cáncer de enfermedades tumorales, en particular del cáncer

40 de pulmón, preferiblemente de cáncer de pulmón de células no pequeñas. En la presente invención, si no se indica de otra manera, las características diferentes de alternativas y realizaciones se pueden combinar entre sí. Además, el término "que comprende" no se debe considerar que significa "que consiste en", si no se menciona específicamente. Sin embargo, en el contexto de la presente invención, el término "que comprende" se puede sustituir con el término "que consiste en", donde sea aplicable.

45 Figuras

Las siguientes Figuras se proponen para ilustrar la invención adicionalmente y no se deben considerarse limitativas de la presente invención a las mismas.

- 50 Figura 1: muestra la secuencia consenso de tallo-bucle de histona generada de secuencias tallo-bucle de metazoarios y protozoarios (como es reportada por Dávila López, M., y Samuelsson, T. (2008), *RNA* (Nueva York, N.Y.), 14(1), 1-10. doi:10.1261/rna.782308). 4.001 secuencias tallo-bucle de histona de metazoarios y protozoarios se alinearon y la cantidad de los nucleótidos que se producen se indica para cada posición en la secuencia tallo-bucle. La secuencia consenso generada que representa todos los nucleótidos presentes en las secuencias analizadas se da utilizando el código de nucleótidos de una letra. Además de la secuencia consenso, las secuencias se muestran presentando al menos 99%, 95% y 90% de los nucleótidos presentes en las secuencias analizadas.

- 55 Figura 2: muestra la secuencia consenso de tallo-bucle de histona generada de la secuencia tallo-bucle de protozoarios (como es reportado por Dávila López, M., y Samuelsson, T. (2008), *RNA* (Nueva York, N.Y.), 14(1), 1-10.

doi:10.1261/rna.782308). 131 secuencias tallo-bucle de histona de protozooario se alinearon y la cantidad de los nucleótidos que se producen se indica para cada posición en la secuencia tallo-bucle. La secuencia consenso generada que representa todos los nucleótidos presentes en las secuencias analizadas se da utilizando el código de nucleótidos de una letra. Además de la secuencia consenso, las secuencias se muestran presentando al menos 99%, 95% y 90% de los nucleótidos presentes en las secuencias analizadas.

Figura 3: muestra la secuencia consenso de tallo-bucle de histona generada de secuencias tallo-bucle de metazoarios (como es reportado por Dávila López, M., y Samuelsson, T. (2008), *RNA* (Nueva York, N.Y.), 14(1), 1-10. doi:10.1261/rna.782308). 3.870 secuencias tallo-bucle de histona de metazoarios se alinearon y la cantidad de los nucleótidos que se producen se indica para cada posición en la secuencia tallo-bucle. La secuencia consenso generada que representa todos los nucleótidos presentes en las secuencias analizadas se da utilizando el código de nucleótidos de una letra. Además de la secuencia consenso, las secuencias se muestran presentando al menos 99%, 95% y 90% de los nucleótidos presentes en las secuencias analizadas.

Figura 4: muestra la secuencia consenso de tallo-bucle de histona generada de secuencias tallo-bucle de vertebrados (como es reportado por Dávila López, M., y Samuelsson, T. (2008), *RNA* (Nueva York, N.Y.), 14(1), 1-10. doi:10.1261/rna.782308). 1.333 secuencias tallo-bucle de histona de vertebrados se alinearon y la cantidad de los nucleótidos que se producen se indica para cada posición en la secuencia tallo-bucle. La secuencia consenso generada que representa todos los nucleótidos presentes en las secuencias analizadas se da utilizando el código de nucleótidos de una letra. Además de la secuencia consenso, las secuencias se muestran presentando al menos 99%, 95% y 90% de los nucleótidos presentes en las secuencias analizadas.

Figura 5: muestra la secuencia consenso de tallo-bucle de histona generada de secuencias tallo-bucle humanas (*Homo sapiens*) (como es reportado por Dávila López, M., y Samuelsson, T. (2008), *RNA* (Nueva York, N.Y.), 14(1), 1-10. doi:10.1261/rna.782308). 84 secuencias tallo-bucle de histona humana se alinearon y la cantidad de los nucleótidos que se producen se indica para cada posición en la secuencia tallo-bucle. La secuencia consenso generada que representa todos los nucleótidos presentes en las secuencias analizadas se da utilizando el código de nucleótidos de una letra. Además de la secuencia consenso, las secuencias se muestran presentando al menos 99%, 95% y 90% de los nucleótidos presentes en las secuencias analizadas.

Figuras 6 a 21: muestran los ARNm de la transcripción *in vitro*. Se da la designación y la secuencia de los ARNm obtenidas por la transcripción *in vitro*. Se utilizan las siguientes abreviaturas:

ppLuc (GC):	secuencia de ARNm enriquecida con GC que codifica la luciferasa de <i>Photinus pyralis</i>
ag:	Región no traducida 3' (UTR) del gen de alfa-globina
A64:	Secuencia poli(A) con 64 adenilatos
A120:	Secuencia poli(A) con 120 adenilatos
histonaSL:	tallo-bucle de histona
aCPSL:	Tallo-bucle seleccionado de una biblioteca por su unión específica de la proteína α CP-2KL
PolioCL:	Hoja de trébol 5' de ARN genómico de virus de polio
G30:	Secuencia poli(G) con 30 guanilatos
U30:	Secuencia poli(U) con 30 uridilatos
SL:	tallo/bucle no específico/artificial
N32:	Secuencia no específica de 32 nucleótidos
NY-ESO-1 (G/C):	Secuencia de ARNm enriquecida en GC que codifica el antígeno tumoral humano NY-ESO-1
Survivina (G/C):	Secuencia de ARNm enriquecida en GC que codifica el antígeno tumoral humano Survivina
MAGE-C1(G/C):	Secuencia de ARNm enriquecida en GC que codifica el antígeno tumoral humano MAGE-C1

En las secuencias, los elementos siguientes están resaltados: región codificadora (ORF) (letras mayúsculas), ag (negrita), histonaSL (subrayado), secuencias adicionales distintas ensayadas (itálica).

Figura 6: muestra la secuencia de ARNm de ppLuc(GC) – **ag** (SEQ ID NO: 43). Mediante linealización del vector original en el sitio de restricción inmediatamente después del 3'-UTR (ag) de alfa-globina, se obtiene el ARNm sin una secuencia de poli(A).

Figura 7: muestra la secuencia de ARNm de ppLuc(GC) – **ag** – A64 (SEQ ID NO: 44). Mediante linealización del vector original en el sitio de restricción inmediatamente después de secuencia A64 poli(A), se obtiene el ARNm terminando con una secuencia A64 poli(A).

Figura 8: muestra la secuencia de ARNm de ppLuc(GC) – **ag** – histonaSL (SEQ ID NO: 45). La secuencia A64 poli(A) se reemplazó por un histonaSL. La secuencia tallo-bucle de histona utilizada en los ejemplos se obtuvo de Cakmakci et al.

(2008). *Molecular and Cellular Biology*, 28(3), 1182-1194.

Figura 9: muestra la secuencia de ARNm de ppLuc(GC) – ag – A64 – histonaSL (SEQ ID NO: 46). La histonaSL se adjuntó en 3' de A64 poli(A).

5 Figura 10: muestra la secuencia de ARNm de ppLuc(GC) – ag – A120 (SEQ ID NO: 47). La secuencia A64 poli(A) se reemplazó por una secuencia A120 poli(A).

Figura 11: muestra la secuencia de ARNm de ppLuc(GC) – ag – A64 – ag (SEQ ID NO: 48). Una segunda 3'-UTR de alfa-globina se adjuntó en 3' de A64 poli(A).

10 Figura 12: muestra la secuencia de ARNm de ppLuc(GC) – ag – A64 – aCPSL (SEQ ID NO: 49). Un tallo-bucle se adjuntó en 3' de A64 poli(A). El tallo-bucle se selecciona de una biblioteca por su unión específica de la proteína α CP-2KL (Thisted et al., (2001), *The Journal of Biological Chemistry*, 276(20), 17484-17496). La α CP-2KL es una isoforma de α CP-2, la proteína α CP más fuertemente expresada (proteína de unión poli(C) de ARNm de alfa-globina) (Makeyev et al., (2000), *Genomics*, 67(3), 301-316), un grupo de proteínas de unión a ARN, que se unen a la 3'-UTR de alfa-globina (Chkheidze et al., (1999), *Molecular and Cellular Biology*, 19(7), 4572-4581).

15 Figura 13: muestra la secuencia de ARNm de ppLuc(GC) – ag – A64 – PolioCL (SEQ ID NO: 50). La hoja de trébol 5' del ARN genómico de virus de polio se adjuntó en 3' de A64 poli(A).

Figura 14: muestra la secuencia de ARNm de ppLuc(GC) – ag – A64 – G30 (SEQ ID NO: 51). Una cadena de 30 guanilatos se adjuntó en 3' de A64 poli(A).

Figura 15: muestra la secuencia de ARNm de ppLuc(GC) – ag – A64 – U30 (SEQ ID NO: 52). Una cadena de 30 uridilatos se adjuntó en 3' de A64 poli(A).

20 Figura 16: muestra la secuencia de ARNm de ppLuc(GC) – ag – A64 – SL (SEQ ID NO: 53). Un tallo-bucle se adjuntó en 3' de A64 poli(A). La parte superior del tallo y el bucle se tomaron de (Babendure et al., (2006), *RNA* (Nueva York, N.Y.), 12(5), 851-861). El tallo-bucle consiste en un tallo rico en CG, de 17 pares de bases de largo, y un bucle de 6 bases de largo.

25 Figura 17: muestra ppLuc(GC) – ag – A64 – N32 (SEQ ID NO: 54). Mediante linealización del vector original en un sitio de restricción alternativo, el ARNm se obtiene con 32 nucleótidos adicionales después del poli(A).

Figura 18: muestra la secuencia de ARNm de NY-ESO-1(GC) – ag – A64 – C30 (SEQ ID NO: 55).

Figura 19: muestra la secuencia de ARNm de NY-ESO-1(GC) – ag – A64 – C30 - histonaSL (SEQ ID NO: 56).

Figura 20: muestra la secuencia de ARNm de Survivina(GC) – ag – A64 – C30 - histonaSL (SEQ ID NO: 57).

Figura 21: muestra la secuencia de ARNm de MAGE-C1(GC) – ag – A64 – C30 - histonaSL (SEQ ID NO: 58).

30 Figura 22: muestra que la combinación de poli(A) e histonaSL incrementa la expresión de proteína de ARNm de forma sinérgica. El efecto de la secuencia poli(A), histonaSL y la combinación de poli(A) e histonaSL en la expresión de luciferasa a partir de ARNm se examinó. Así, diferentes ARNm se electroporaron en células HeLa. Los niveles de luciferasa se midieron a 6, 24, y 48 horas después de la transfección. Se expresa poca luciferasa a partir de ARNm que no tiene ni secuencia de poli(A) ni histonaSL. Tanto la secuencia poli(A) como la histonaSL incrementan el nivel de luciferasa. Sorprendentemente, sin embargo, la combinación de poli(A) e histonaSL incrementa en gran medida además el nivel de luciferasa, multiplicándose por arriba del nivel observado con cualquiera de los elementos individuales, actuando entonces sinérgicamente. Los datos se muestran como RLU media \pm SD (unidades de luz relativa \pm desviación estándar) para transfecciones por triplicado. Las RLU específicas se resumen en el Ejemplo 14.2.

40 Figura 23: muestra que la combinación de poli(A) e histonaSL incrementa la expresión de proteína a partir de ARNm independiente de su orden. El efecto de la secuencia poli(A), histonaSL, la combinación de poli(A) e histonaSL, y su orden en la expresión de luciferasa a partir de ARNm se examinó. Así, se lipofectaron diferentes ARNm en células HeLa. Los niveles de luciferasa se midieron a 6, 24, y 48 horas después del inicio de la transfección. Tanto una secuencia A64 poli(A) o la histonaSL dan origen a niveles de luciferasa comparables. El incremento de la longitud de la secuencia poli(A) de A64 a A120 o a A300 incrementa el nivel de luciferasa moderadamente. En contraste, la combinación de poli(A) e histonaSL incrementa el nivel de luciferasa mucho más que el alargamiento de la secuencia poli(A). La combinación de poli(A) e histonaSL actúa sinérgicamente conforme se incrementa el múltiple de nivel de luciferasa por arriba del nivel observado con cualquiera de los elementos individuales. El efecto sinérgico de la combinación de poli(A) e histonaSL se observa independientemente del orden de poli(A) e histonaSL e independientemente de la longitud de poli(A) con ARNm de A64-histonaSL o histonaSL-A250. Los datos se muestran como RLU media \pm SD para las transfecciones en triplicado. Las RLU específicas se resumen en el Ejemplo 14.3.

50 Figura 24: muestra que la elevación en la expresión de proteína por la combinación de poli(A) e histonaSL es específica. El efecto de combinar poli(A) e histonaSL o poli(A) y las secuencias alternativas en la expresión de luciferasa a partir de

ARNm se examinó. Así, diferentes ARNm se electroporaron en células HeLa. Los niveles de luciferasa se midieron a 6, 24, y 48 horas después de la transfección. Tanto una secuencia poli(A) o la histonaSL dan origen a niveles de luciferasa comparables. La combinación de poli(A) e histonaSL incrementa en gran medida el múltiple de nivel de luciferasa por arriba del nivel observado con cualquiera de los elementos individuales, actuando así sinérgicamente. En contraste, la combinación de poli(A) con cualquiera de las otras secuencias no tiene efecto en el nivel de luciferasa comprado con el ARNm que contiene solo una secuencia poli(A). De esta manera, la combinación de poli(A) e histonaSL actúa específicamente y sinérgicamente. Los datos se muestran como RLU media \pm SD para las transfecciones en triplicado. Las RLU específicas se resumen en el Ejemplo 14.4.

Figura 25: muestra que la combinación de poli(A) e histonaSL incrementa la expresión de proteína a partir de ARNm de una manera sinérgica *in vivo*. El efecto de la secuencia poli(A), histonaSL y la combinación de poli(A) e histonaSL en la expresión de luciferasa a partir de ARNm *in vivo* se examinó. Así, diferentes ARNm se inyectaron intradérmicamente en ratones. Los ratones se sacrificaron 16 horas después de la inyección y los niveles de luciferasa en los sitios de inyección se midieron. La luciferasa se expresa a partir de ARNm que tiene ya sea una histonaSL o una secuencia poli(A). Sorprendentemente, sin embargo, la combinación de poli(A) e histonaSL incrementa en gran medida el múltiple de nivel de luciferasa por arriba del nivel observado con cualquiera de los elementos individuales, actuando entonces sinérgicamente. Los datos se muestran como RLU media \pm SEM (unidades de luz relativa \pm error estándar de la media). Las RLU específicas se resumen en el Ejemplo 14.5.

Figura 26: muestra que la combinación de poli(A) e histonaSL incrementa la expresión de la proteína NY-ESO-1 a partir de ARNm. El efecto de la secuencia poli(A) y la combinación de poli(A) e histonaSL en la expresión de NY-ESO-1 a partir de ARNm se examinó. Así, diferentes ARNm se electroporaron en células HeLa. Los niveles de NY-ESO-1 se midieron a 24 horas después de la transfección por citometría de flujo. La NY-ESO-1 se expresa a partir de ARNm que tiene solo una secuencia poli(A). Sorprendentemente, sin embargo, la combinación de poli(A) e histonaSL incrementa en gran medida el nivel de NY-ESO-1, por arriba del nivel observado con solo una secuencia poli(A). Los datos se muestran como conteos frente a la intensidad de fluorescencia. Las intensidades de fluorescencia medias (MFI) se resumen en el Ejemplo 14.6.

Figura 27: muestra que la combinación de poli(A) e histonaSL incrementa el nivel de los anticuerpos inducidos por la vacunación con ARNm. El efecto de la secuencia poli(A) y la combinación de poli(A) e histonaSL en la inducción de anticuerpos anti NY-ESO-1 inducidos por vacunación con el ARNm se examinó. Así, ratones C57BL/6 se vacunaron intradérmicamente con diferentes ARNm en complejo con protamina. El nivel de anticuerpos específicos de NY-ESO-1 en los ratones vacunados y control se analizó por el ELISA con diluciones en serie de sueros. La IgG2a[b] anti-NY-ESO-1 se indujo por el ARNm que tiene solo una secuencia poli(A). Sorprendentemente, sin embargo, la combinación de poli(A) e histonaSL incrementa en gran medida el nivel de IgG2a[b] anti-NY-ESO-1, por arriba del nivel observado con solo una secuencia de poli(A). Los datos se muestran como titulaciones de punto final medio. Las titulaciones de punto final medio se resumen en el Ejemplo 14.7.

55 Ejemplos:

Los siguientes Ejemplos se proponen para ilustrar la invención adicionalmente y no deben considerarse para limitar la presente invención a los mismos.

1. Generación de las secuencias consenso de tallo-bucle de histona

Antes de los experimentos, las secuencias consenso de tallo-bucle de histona se determinaron en base a las secuencias tallo-bucle de histona de metazoarios y protozoarios. Las secuencias se tomaron del suplemento proporcionado por López et al., (Dávila López, M., y Samuelsson, T. (2008), RNA (Nueva York, N.Y.), 14(1), 1-10. doi:10.1261/rna.782308), quien identificó un gran número de secuencias tallo-bucle de histona naturales al investigar las secuencias genómicas y las etiquetas de secuencia expresada. Primero, todas las secuencias de metazoarios y protozoarios (4.001 secuencias), o todas las secuencias de los protozoarios (131 secuencias) o alternativamente de metazoarios (3.870 secuencias), o de vertebrados (1.333 secuencias) o de humanos (84 secuencias) se agruparon y se alinearon. Después, la cantidad de los nucleótidos que se producen se determinó para cada posición. Basado en las tablas así obtenidas, las secuencias consenso para los 5 diferentes grupos de secuencias se generaron mostrando todos los nucleótidos presentes en las secuencias analizadas. Además, también se obtuvieron secuencias consenso más restrictivas, enfatizando de manera creciente nucleótidos conservados.

50 2. Preparación de moldes de ADN

Se construyó un vector para la transcripción *in vitro* que contenía un promotor T7 seguido por una secuencia enriquecida en GC que codifica la luciferasa de *Photinus pyralis* (ppLuc(GC)), la parte central de la región no traducida 3' (UTR) de la alfa-globina (ag), y una secuencia poli(A). La secuencia poli(A) se siguió inmediatamente por un sitio de restricción utilizado para la linealización del vector antes de la transcripción *in vitro* con el fin de obtener el ARNm que termina en una secuencia A64 poli(A). El ARNm obtenido de este vector por consiguiente por la transcripción *in vitro* se designa "ppLuc(GC) – ag – A64".

La linealización de este vector en los sitios de restricción alternativos antes de la transcripción *in vitro* permitió obtener el ARNm ya sea extendido por los nucleótidos adicionales en 3' de A64 o que carecen de A64. Además, el vector original se modificó para incluir secuencias alternativas. En resumen, los siguientes ARNm se obtuvieron de estos vectores por transcripción *in vitro* (las secuencias de ARNm se proporcionan en las Figuras 6 a 17):

5	ppLuc(GC) – ag	(SEQ ID NO: 43)
	ppLuc(GC) – ag – A64	(SEQ ID NO: 44)
	ppLuc(GC) – ag – histonaSL	(SEQ ID NO: 45)
	ppLuc(GC) – ag – A64 – histonaSL	(SEQ ID NO: 46)
	ppLuc(GC) – ag – A120	(SEQ ID NO: 47)
10	ppLuc(GC) – ag – A64 – ag	(SEQ ID NO: 48)
	ppLuc(GC) – ag – A64 – aCPSL	(SEQ ID NO: 49)
	ppLuc(GC) – ag – A64 – PolioCL	(SEQ ID NO: 50)
	ppLuc(GC) – ag – A64 – G30	(SEQ ID NO: 51)
	ppLuc(GC) – ag – A64 – U30	(SEQ ID NO: 52)
15	ppLuc(GC) – ag – A64 – SL	(SEQ ID NO: 53)
	ppLuc(GC) – ag – A64 – N32	(SEQ ID NO: 54)

Adicionalmente, las secuencias de plásmido de ADN que codifican los antígenos tumorales NY-ESO-1, Survivina y MAGE-C1 se prepararon entonces como se describe anteriormente.

En resumen, los siguientes ARNm se obtuvieron de estos vectores por transcripción *in vitro* (las secuencias de ARNm se proporcionan en las Figuras 18 a 21):

	NY-ESO-1(GC) - ag – A62 – C30	(SEQ ID NO: 55)
	NY-ESO-1(GC) - ag – A62 – C30 – histonaSL	(SEQ ID NO: 56)
	Survivina(GC) – ag – A62 – C30 – histonaSL	(SEQ ID NO: 57)
	MAGE-C1(GC) – ag – A64 – C30 – histonaSL	(SEQ ID NO: 58)

25 3. Transcripción *in vitro*

El molde de ADN de acuerdo con el Ejemplo 2 se linealizó y se transcribió *in vitro* utilizando T7-Polimerasa. El molde de ADN se digirió por tratamiento con ADNasa. Todos los transcritos de ARNm contenían una estructura 5'-CAP obtenida al agregar un exceso de N7-Metil-Guanosina-5'-Trifosfato-5'-Guanosina a la reacción de transcripción. El ARNm así obtenido se purificó y se resuspendió en agua.

30 4. Adenilación Enzimática del ARNm

Dos ARNm se adenilaron enzimáticamente:

ppLuc(GC) – ag – A64 y ppLuc(GC) – ag – histonaSL.

Para este fin, el ARN se incubó con Poli(A)-polimerasa de *E. coli* y ATP (Poli(A)-polimerasa Tailing Kit, Epicentre, Madison, EEUU) siguiendo las instrucciones del fabricante. El ARNm con la secuencia poli(A) extendida se purificó y se resuspendió en agua. La longitud de la secuencia poli(A) se determinó por electroforesis en gel de agarosa. Los ARNm de inicio se extendieron en aproximadamente 250 adenilatos, los ARNm obtenidos se designan ppLuc(GC) – ag – A300 y ppLuc(GC) – ag – histonaSL – A250, respectivamente.

5. Expresión de luciferasa por electroporación del ARNm

40 Células HeLa se tripsinizaron y se lavaron en opti-MEM. Se electroporaron 1×10^5 células en 200 μ l de opti-MEM cada una con 0,5 μ g de ARNm que codifica ppLuc. Como control, el ARNm que no codifica ppLuc se electroporó separadamente. Las células electroporadas se sembraron en placas de 24 pocillos en 1 ml de un medio RPMI 1640. 6, 24, o 48 horas después de la transfección, el medio se aspiró y las células se lisaron en 200 μ l de tampón de lisis (Tris 25 mM, pH 7,5 (HCl), EDTA 2 mM, 10% de glicerol, 1% de Triton X-100, DTT 2 mM, PMSF 1 mM). Los lisados se almacenaron a -20°C hasta que se midió la actividad de ppLuc.

45 6. Expresión de luciferasa por lipofección de ARNm

50 Las células HeLa se sembraron en placas de 96 pocillos en una densidad de 2×10^4 células por pocillo. Al siguiente día, las células se lavaron en opti-MEM y luego se transfectaron con 0,25 μ g de ARNm que codifica ppLuc en complejo con Lipofectina en 150 μ l de opti-MEM. Como control, el ARNm que no codifica ppLuc se lipofectó separadamente. En algunos pocillos, el opti-MEM se aspiró y las células se lisaron en 200 μ l de tampón de lisis 6 horas después del inicio de la transfección. En los pocillos restantes, el opti-MEM se intercambió por medio RPMI 1640 en ese tiempo. En estos pocillos, el medio se aspiró y las células se lisaron en 200 μ l de tampón de lisis 24 o 48 horas después del inicio de la transfección. Los lisados se almacenaron a -20°C hasta que se midió la actividad de ppLuc.

7. Medida de la luciferasa

La actividad de ppLuc se midió como unidades de luz relativas (RLU) en un lector de placas BioTek SynergyHT en un tiempo de medición de 5 segundos utilizando 50 µl de lisado y 200 µl de tampón de luciferina (Glicilglicina 25 mM, pH 7,8 (NaOH), MgSO₄ 15 mM, ATP 2 mM, 75 µM de luciferina). Las RLU específicas se calcularon restando la RLU del ARN de control de la RLU total.

8. Expresión de Luciferasa por inyección intradérmica de ARNm (expresión de Luciferasa *in vivo*).

Se anestesiaron ratones con una mezcla de Rompun y Ketavet. Cada ARNm que codifica ppLuc se inyectó intradérmicamente (0,5 µg de ARNm en 50 µl por inyección). Como control, el ARNm que no codifica ppLuc se inyectó separadamente. 16 horas después de la inyección, los ratones se sacrificaron y se recolectaron los tejidos. Las muestras de tejido se congelaron instantáneamente en nitrógeno líquido y se lisaron en un lisador de tejido (Qiagen) en 800 µl de tampón de lisis (Tris 25 mM, pH 7,5 (HCl), EDTA 2 mM, 10% de glicerol, 1% de Tritón X-100, DTT 2 mM, PMSF 1 mM). Subsecuentemente, las muestras se centrifugaron a 13.500 rpm a 4°C durante 10 minutos. Los lisados se almacenaron a -80°C hasta que la actividad de ppLuc se midió (véase 7. Medición de luciferasa).

9. Expresión de NY-ESO-1 por electroporación de ARNm

Se tripsinizaron células HeLa y se lavaron en opti-MEM. Se electroporaron 2x10⁵ células en 200 µl de opti-MEM con 10 µg de ARNm que codifica NY-ESO-1. Las células de tres electroporaciones se combinaron y se sembraron en una placa de 6 pocillos en 2 ml del medio RPMI 1640. 24 horas después de la transfección, las células se recolectaron y se transfirieron en una placa de fondo en forma de V de 96 pocillos (2 pocillos por ARNm). Las células se lavaron con una solución salina tamponada con fosfato (PBS) y se permeabilizaron con 200 µl por pocillo de Citofix/Citoperm (Becton Dickinson (BD)). Después de 15 minutos, las células se lavaron con PermWash (BD). Después, las células se incubaron durante 1 hora a temperatura ambiente bien con IgG1 anti-NY-ESO-1 de ratón o con un control de isotipo (20 µg/ml). Las células se lavaron dos veces con PermWash nuevamente. Después, las células se incubaron durante 1 hora a 4°C a una dilución de 1:500 de IgG anti-ratón de cabra acoplada a Alexa-647. Finalmente, las células se lavaron dos veces con PermWash. Las células se resuspendieron en 200 µl de tampón (PBS, 2% de FCS, EDTA 2 mM, 0,01% de azida sódica). La expresión de NY-ESO-1 se cuantificó por citometría de flujo como intensidad de fluorescencia media (MFI).

10. Inducción de anticuerpos anti-NY-ESO-1 por vacunación con ARNm

Se vacunaron ratones C57BL/6 intradérmicamente con ARNm que codifica NY-ESO-1 en complejo con protamina (5 veces en 14 días). Los ratones control se trataron con tampón. El nivel de anticuerpos específicos de NY-ESO-1 en los ratones vacunados y de control se analizó 8 días después de la última vacunación por ELISA: placas de ELISA de 96 pocillos (Nunc) se recubrieron con 100 µl por pocillo de 10 µg/ml de proteína NY-ESO-1 recombinante durante 16 horas a 4°C. Las placas se lavaron dos veces con tampón de lavado (PBS, 0,05% de Tween-20). Para bloquear la unión no específica, las placas luego se incubaron durante 2 horas a 37°C con tampón de bloqueo (PBS, 0,05% de Tween-20, 1% de BSA). Después del bloqueo, se añadieron 100 µl por pocillo de suero de ratón diluido en serie y se incubó durante 4 horas a temperatura ambiente. Las placas luego se lavaron tres veces con tampón de lavado. Después, 100 µl por pocillo de anticuerpo de detección IgG2a[b] anti-ratón de rata biotinilado (BD Biosciences) diluido a 1:600 en tampón de bloqueo se dejó unir durante 1 hora a temperatura ambiente. Las placas se lavaron nuevamente tres veces con tampón de lavado, seguido por incubación durante 30 minutos a temperatura ambiente con 100 µl por pocillo de estreptavidina acoplada a peroxidasa de rábano picante. Después de cuatro lavados con tampón de lavado, se añadieron 100 µl por pocillo de 3,3',5,5'-tetrametilbencidina (Thermo Scientific). Después del cambio resultante en el color, se añadieron 100 µl por pocillo de ácido sulfúrico al 20%. La absorbancia se midió a 405 nm.

11. Inducción de anticuerpos anti-Survivina por vacunación con ARNm

Se vacunaron ratones C57BL/6 intradérmicamente con ARNm que codifica Survivina en complejo con protamina (5 veces en 14 días). Los ratones control se trataron con tampón. El nivel de los anticuerpos específicos de Survivina en ratones vacunados y de control se analizó 8 días después de la última vacunación por ELISA: placas de ELISA de 96 pocillos (Nunc) se recubrieron con 100 µl por pocillo de 10 µg/ml de proteína Survivina recombinante durante 16 horas a 4°C. Las placas se lavaron dos veces con tampón de lavado (PBS, 0,05% de Tween-20). Para bloquear la unión no específica, las placas luego se incubaron durante 2 horas a 37°C con tampón de bloqueo (PBS, 0,05% de Tween-20, 1% de BSA). Después del bloqueo, se añadieron 100 µl por pocillo de suero de ratón diluido en serie y se incubaron durante 4 horas a temperatura ambiente. Las placas luego se lavaron tres veces con tampón de lavado. Después, 100 µl por pocillo de anticuerpo de detección IgG2a[b] anti-ratón de rata biotinilado (BD Biosciences) diluido 1:600 en tampón de bloqueo se dejó unir durante 1 hora a temperatura ambiente. Las placas se lavaron nuevamente tres veces con tampón de lavado, seguido por incubación durante 30 minutos a temperatura ambiente con 100 µl por pocillo de estreptavidina acoplada a peroxidasa de rábano picante. Después de cuatro lavados con tampón, se añadieron 100 µl por pocillo de 3,3',5,5'-tetrametilbencidina (Thermo Scientific). Después del cambio resultante en el color, se añadieron 100 µl por pocillo de ácido sulfúrico al 20%. La absorbancia se midió a 405 nm.

12. Inducción de anticuerpos anti-MAGE-C1 por vacunación con ARNm

Se vacunaron ratones C57BL/6 intradérmicamente con ARNm que codifica MAGE-C1 en complejo con protamina (5 veces en 14 días). Los ratones control se trataron con tampón. El nivel de anticuerpos específicos de MAGE-C1 en los ratones vacunados y de control se analizó 8 días después de la última vacunación por ELISA: placas de ELISA de 96 pocillos (Nunc) se recubrieron con 100 µl por pocillo de 10 µg/ml de proteína MAGE-C1 recombinante durante 16 horas a 4°C. Las placas se lavaron dos veces con tampón de lavado (PBS, 0,05% de Tween-20). Para bloquear la unión no específica, las placas luego se incubaron durante 2 horas a 37°C con tampón de bloqueo (PBS, 0,05% de Tween-20, 1% de BSA). Después del bloqueo, se añadieron 100 µl por pocillo de suero de ratón diluido en serie y se incubó durante 4 horas a temperatura ambiente. Las placas luego se lavaron tres veces con tampón de lavado. Después, 100 µl por pocillo de anticuerpo de detección IgG2a[b] anti-ratón de rata biotinilado (BD Biosciences) diluido 1:600 en tampón de bloqueo se dejó unir durante 1 hora a temperatura ambiente. Las placas se lavaron nuevamente tres veces con tampón de lavado, seguido por incubación durante 30 minutos a temperatura ambiente con 100 µl por pocillo de estraptividina acoplada a peroxidasa de rábano picante. Después de cuatro lavados con tampón de lavado, se añadieron 100 µl por pocillo de 3,3',5,5'-tetrametilbenzidina (Thermo Scientific). Después del cambio resultante en el color, se añadieron 100 µl por pocillo de ácido sulfúrico al 20%. La absorbancia se midió a 405 nm.

13. Detección de una respuesta inmunitaria celular específica de antígeno (respuesta inmunitaria de células T) por ELISPOT:

Se vacunaron ratones C57BL/6 intradérmicamente con ARNm que codifica MAGE-C1 en complejo con protamina (5 veces en 14 días). Los ratones control se trataron con tampón. 1 semana después de la última vacunación los ratones se sacrificaron, los bazo se retiraron y los esplenocitos se aislaron. Los esplenocitos se re-estimularon durante 7 días en presencia de péptidos del antígeno anterior (biblioteca de péptidos) o se co-incubaron con células dendríticas generadas de células de médula ósea de ratones singénicos nativos, que se electroporaron con ARNm que codifica el antígeno. Para determinar una respuesta inmunitaria celular específica de antígeno se midió la secreción de IFN γ después de la re-estimulación. Para la detección de IFN γ una placa multiscreen de recubrimiento (Millipore) se incubó durante la noche con tampón de recubrimiento, tampón carbonato-bicarbonato 0,1M pH 9,6, 10,59 g/l de Na₂CO₃, 8,4g/l de NaHCO₃ que comprende el anticuerpo frente a IFN γ (BD Pharmingen, Heidelberg, Alemania). Los estimuladores y las células efectoras se incubaron conjuntamente en la placa en la relación de 1:20 durante 24h. La placa se lavó con 1xPBS y se incubó con un anticuerpo secundario acoplado a biotina. Después del lavado con 1xPBS/0,05% de Tween-20 el sustrato (Sistema de Sustrato Líquido de Fosfato de 5-Bromo-4-Cloro-3-Indolilo/Tetrazolio Azul Nitro de Sigma Aldrich, Taufkirchen, Alemania) se agregó a la placa y la conversión del sustrato pudo detectarse visualmente.

14. Resultados

14.1 Secuencias tallo-bucle de histona:

Con el fin de caracterizar las secuencias tallo-bucle de histona, las secuencias de metazoarios y protozoarios (4.001 secuencias), o de protozoarios (131 secuencias) o alternativamente de metazoarios (3.870 secuencias), o de vertebrados (1.333 secuencias), o de humanos (84 secuencias) se agruparon y se alinearon. Después, la cantidad de los nucleótidos que se producen se determinó por cada posición. Basado en las tablas obtenidas de esta manera, las secuencias consenso para los 5 grupos diferentes de secuencias se generaron presentando todos los nucleótidos presentes en las secuencias analizadas. Dentro de la secuencia consenso de metazoarios y protozoarios combinados, se conservan 3 nucleótidos, un T/U en el bucle y una G y una C en el tallo, formando un par de bases. Estructuralmente, típicamente se forma un tallo de 6 pares de bases y un bucle de 4 nucleótidos. Sin embargo, las estructuras de desviación son comunes: de 84 tallos-bucles de histona humanos, dos contienen un tallo de solamente 5 nucleótidos que comprenden 4 pares de bases y un error de coincidencia. Otro tallo-bucle de histona humano contiene un tallo de solo 5 pares de bases. Cuatro más de los tallos-bucles de histona humanos contienen un tallo de 6 nucleótidos de largo, pero incluyen un error de coincidencia en tres posiciones diferentes, respectivamente. Adicionalmente, cuatro tallos-bucles de histona humanos contienen un par de bases oscilante en dos posiciones diferentes, respectivamente. Con respecto al bucle, una longitud de 4 nucleótidos parece que no se requiere estrictamente, ya que un bucle de 5 nucleótidos se ha identificado en *D. discoideum*.

Además de las secuencias consenso que representan todos los nucleótidos presentes en las secuencias analizadas, también se obtuvieron secuencias consenso más restrictivas enfatizando de manera creciente nucleótidos conservados. En resumen, se obtuvieron las siguientes secuencias:

- (Cons): representa todos los nucleótidos presentes
- (99%): representa al menos 99% de todos los nucleótidos presentes
- (95%): representa al menos 95% de todos los nucleótidos presentes
- (90%): representa al menos 90% de todos los nucleótidos presentes

Los resultados del análisis de las secuencias tallo-bucle de histona se resumen en las siguientes Tablas 1 a 5 (véase también la Fig. 1 a 5):

Tabla 2: Secuencia consenso tallo-bucle de histona de protozoario: (basado en un alineamiento de 131 secuencias de tallo-bucle de histona de protozoario) (véase también la Fig. 2)

# A	52	32	71	82	76	13	0	12	12	9	1	46	3	0	75	82	53	79	20	0	4	94	17	35	74	56
# T	20	32	37	21	8	3	0	21	85	58	86	70	65	131	28	1	17	13	10	0	15	7	31	32	20	28
# C	45	59	20	25	38	0	0	86	8	54	42	13	58	0	27	2	6	31	10	131	112	5	82	58	30	40
# G	14	8	3	3	9	115	131	12	26	10	2	2	5	0	1	46	55	8	91	0	0	25	1	6	7	7
Cons	N*	N*	N	N	N	D	G	N	N	N	N	N	N	T	N	N	N	N	N	C	H	N	N	N*	N*	N*
99%	N*	N*	N	N	N	D	G	N	N	N	B	N	N	T	H	V	N	N	N	C	H	N	H	N*	N*	N*
95%	N*	N*	H	H	N	R	G	N	N	N	Y	H	B	T	H	R	D	N	N	C	Y	D	H	H*	N*	N*
90%	N*	H*	H	H	V	R	G	N	D	B	Y	H	Y	T	H	R	D	H	N	C	Y	R	H	H*	H*	H*

Tabla 4: Secuencia consenso tallo-bucle de histona de vertebrado: (basado en un alineamiento de 1.333 secuencias de tallo-bucle de histona de vertebrado) (véase también la Fig. 4)

# A	661	146	1315	1323	920	8	0	1	0	0	0	0	0	1	4	0	441	1333	0	1199	21	0	1	1126	26	81	380	960
# T	63	121	2	2	6	2	0	39	1217	2	1331	1329	1207	1333	30	0	1	0	1	0	1	0	2	1	22	91	91	12
# C	601	1062	16	6	403	1	0	1293	116	1331	2	0	121	0	862	0	2	0	0	1333	1328	128	1284	1143	834	361		
# G	8	4	0	2	4	1322	1333	0	0	0	0	3	1	0	0	0	1330	134	1311	0	2	78	1	18	28	0		
Cons	N*	N*	H	N	N	N	G	H	Y	Y	Y	D	N	T	H	A	B	R	D	C	N	N	N	N	N	N*	N*	H*
99%	H*	H*	M	A	M	G	G	Y	Y	C	T	T	Y	T	H	A	G	R	R	C	C	V	H	N*	N*	M*		
95%	H*	H*	A	A	M	G	G	C	Y	C	T	Y	T	M	A	G	R	G	G	C	C	V	C	H*	H*	M*		
90%	M*	M*	A	A	M	G	G	C	T	C	T	T	T	M	A	G	R	G	G	C	C	M	C	Y*	M*	M*		

Tabla 5: Secuencia consenso tallo-bucle de histona de *Homo sapiens*: (basado en un alineamiento de 84 secuencias de tallo-bucle de histona de humano) (véase también la Fig. 5)

#A	10	17	84	84	76	1	0	1	0	0	1	0	0	0	0	0	1	0	0	12	84	0	65	3	0	0	0	69	5	0	10	64									
#T	8	6	0	0	2	2	0	1	67	0	84	80	81	84	5	0	0	0	0	5	0	0	0	0	0	0	0	4	25	24	3										
#C	62	61	0	0	6	0	0	82	17	84	0	0	3	0	67	0	1	0	0	67	0	1	0	0	0	84	84	5	75	57	44	17									
#G	4	0	0	0	0	81	84	0	0	0	0	3	0	0	0	0	83	19	81	0	0	0	10	0	2	6	0	0	2	6	0										
Cons	N*	H*	A	A	H	D	G	H	Y	C	T	D	Y	T	H	A	S	R	R	C	C	C	V	H	B*	N*	H*	H*	N*	H*	H*	N*	H*								
99%	N*	H*	A	A	H	D	G	H	Y	C	T	D	Y	T	H	A	S	R	R	C	C	C	V	H	B*	N*	H*	H*	N*	H*											
95%	H*	A	A	A	M	G	G	C	Y	C	T	T	T	T	H	A	G	R	G	C	C	C	V	M	Y*	N*	M*	M*													
90%	H*	M*	A	A	A	G	G	C	Y	C	T	T	T	T	M	A	G	R	G	C	C	C	R	M	Y*	H*	M*														

Donde las abreviaturas utilizadas se definen como sigue:

abreviatura	Bases de nucleótidos	observaciones
G	G	Guanina
A	A	Adenina
T	T	Timina
U	U	Uracilo
C	C	Citosina
R	G o A	Purina
Y	T/U o C	Pirimidina
M	A o C	Amino
K	G o T/U	Ceto
S	G o C	Fuerte (uniones 3H)
W	A o T/U	Débil (uniones 2H)
H	A o C o T/U	No G
B	G o T/U o C	No A
V	G o C o A	No T/U
D	G o A o T/U	No C
N *	G o C o T/U o A presentes o no	Cualquier base La base puede estar o no presente

14.2 La combinación de poli(A) e histonaSL incrementa la expresión de proteínas a partir del ARNm de forma sinérgica.

- 5 Para investigar el efecto de la combinación de poli(A) e histonaSL en la expresión de proteínas a partir del ARNm, ARNm con diferentes secuencias 3' de la 3'-UTR de alfa-globina se sintetizaron: los ARNm terminaron ya sea justo en 3' de la 3'-UTR, careciendo así tanto de la secuencia poli(A) como histonaSL, o contenían ya sea una secuencia A64 poli(A) o una histonaSL en su lugar, o tanto A64 poli(A) como histonaSL 3' de la 3'-UTR. Los ARNm que codifican Luciferasa o el ARNm control se electroporaron en células HeLa. Los niveles de Luciferasa se midieron a 6, 24, y 48 horas después de la transfección (véase la siguiente Tabla 6 y la Figura 22).
- 10

Tabla 6:

ARNm	RLU 6 horas	RLU 24 horas	RLU 48 horas
ppLuc(GC)-ag-A64-histonaSL	466.553	375.169	70.735
ppLuc(GC)-ag-histonaSL	50.947	3.022	84
ppLuc(GC)-ag-A64	10.471	19.529	4.364
ppLuc(GC)-ag	997	217	42

- 15 Se expresó poca Luciferasa a partir del ARNm que no tiene ni secuencia poli(A) ni histonaSL. Tanto una secuencia poli(A) o la histonaSL incrementaron el nivel de luciferasa en un grado similar. Cualquiera de los dos ARNm dio origen a un nivel de luciferasa mucho más alto de lo que hizo el ARNm que carece tanto de poli(A) como de histonaSL. Sorprendentemente, sin embargo, la combinación de poli(A) e histonaSL incrementó en gran medida el nivel de luciferasa, aumentando por encima del nivel observado con cualquiera de los elementos individuales. La magnitud de la elevación en el nivel de luciferasa debido a la combinación de poli(A) e histonaSL en el mismo ARNm demuestra que actúan sinérgicamente.

- 20 La sinergia entre poli(A) e histonaSL se cuantificó al dividir la señal del ARNm de poli(A)-histonaSL (+/+) por la suma de las señales de ARNm de histonaSL (-/+) más ARNm de poli(A) (+/-) (véase la siguiente Tabla 7).

Tabla 7:

	A64	histonaSL	RLU 6 horas	RLU 24 horas	RLU 48 horas
	+	+	466.553	375.169	70.735
	-	+	50.947	3.022	84
	+	-	10.471	19.529	4.364

Sinergia			7,6	16,6	15,9
-----------------	--	--	------------	-------------	-------------

El factor así calculado especifica cuánto más es el nivel de luciferasa del ARNm que combina poli(A) e histonaSL de lo que se esperaría si los efectos de poli(A) e histonaSL fueron puramente aditivos. El nivel de luciferasa de ARNm que combina poli(A) e histonaSL fue hasta 16,6 veces más alto que si sus efectos fueran sumamente aditivos. Este resultado confirma que la combinación de poli(A) e histonaSL lleva a cabo un incremento notablemente sinérgico en la expresión de proteínas.

14.3 La combinación de poli(A) e histonaSL incrementa la expresión de proteínas a partir del ARNm independientemente de su orden.

El efecto de la combinación de poli(A) e histonaSL podría depender de la longitud de la secuencia poli(A) y del orden de poli(A) e histonaSL. De esta manera, se sintetizaron los ARNm con longitud creciente de secuencia poli(A) y el ARNm con poli(A) e histonaSL en el orden inverso: Dos ARNm contenían en 3' de la 3'-UTR ya sea una secuencia A120 o A300 poli(A). Un ARNm adicional contenía en 3' de la 3'-UTR primero una histonaSL seguido por una secuencia A250 poli(A). Los ARNm que codifican luciferasa o el ARNm de control se lipofectaron en células HeLa. Los niveles de luciferasa se midieron a 6, 24, y 48 horas después del inicio de la transfección (véase la siguiente Tabla 8 y la Figura 23).

Tabla 8:

ARNm	RLU 6 horas	RLU 24 horas	RLU 48 horas
ppLuc(GC)-ag-histonaSL-A250	98.472	734.222	146.479
ppLuc(GC)-ag-A64-histonaSL	123.674	317.343	89.579
ppLuc(GC)-ag-histonaSL	7.291	4.565	916
ppLuc(GC)-ag-A300	4.357	38.560	11.829
ppLuc(GC)-ag-A120	4.371	45.929	10.142
ppLuc(GC)-ag-A64	1.928	26.781	537

Tanto una secuencia A64 poli(A) o la histonaSL dieron lugar a niveles de luciferasa comparables. De acuerdo con el experimento previo la combinación de A64 e histonaSL incrementó en gran medida el nivel de luciferasa, aumentando por encima del nivel observado con cualquiera de los elementos individuales. La magnitud de la elevación en el nivel de luciferasa debido a la combinación de poli(A) e histonaSL en el mismo ARNm demuestra que están actuando sinérgicamente. La sinergia entre A64 e histonaSL se cuantificó como anteriormente en base a los niveles de luciferasa de ARNm de A64-histonaSL, A64, e histonaSL (véase la siguiente Tabla 9). El nivel de luciferasa de ARNm que combina A64 e histonaSL fue hasta 61,7 veces más alto que si los efectos de la poli(A) e histonaSL fueran puramente aditivos.

Tabla 9:

	A64	histonaSL	RLU 6 horas	RLU 24 horas	RLU 48 horas
	+	+	123.674	317.343	89.579
	-	+	7.291	4.565	916
	+	-	1.928	26.781	537
Sinergia			13,4	10,1	61,7

En contraste, el incremento de la longitud de la secuencia poli(A) de A64 a A120 o a A300 incrementó el nivel de luciferasa solo moderadamente (véase la Tabla 8 y la Figura 19).

El ARNm con la secuencia poli(A) más larga, A300, también se comparó con el ARNm donde se combinó una secuencia poli(A) de longitud similar con la histonaSL, histonaSL-A250. Además de tener una secuencia de poli(A) larga, el orden de histonaSL y poli(A) se invirtió en este ARNm respecto al ARNm de A64-histonaSL. La combinación de A250 e histonaSL incrementó en gran medida el nivel de luciferasa, aumentando por encima del nivel observado por ya sea histonaSL o A300. Nuevamente, la sinergia entre A250 e histonaSL se cuantificó como anteriormente comparando la RLU del ARNm de histonaSL-A250 con la RLU de ARNm de A300 más ARNm de histonaSL (véase la siguiente Tabla 10). El nivel de luciferasa del ARNm que combina A250 e histonaSL fue hasta 17,0 veces más alto que si los efectos de poli(A) e histonaSL fueran puramente aditivos.

Tabla 10:

	histonaSL	A250/A300	RLU 6 horas	RLU 24 horas	RLU 48 horas
	+	+	98.472	734.222	146.479
	+	-	7.291	4.565	916
	-	+	4.357	38.560	11.829
Sinergia			8,5	17,0	11,5

5 En resumen, un efecto sumamente sinérgico de la combinación de histonaSL y poli(A) en la expresión de proteínas a partir del ARNm se ha demostrado para longitudes sustancialmente diferentes de poli(A) e independientemente del orden de poli(A) e histonaSL.

14.4 La elevación en la expresión de proteínas por la combinación de poli(A) e histonaSL es específica

10 Para investigar si el efecto de la combinación de poli(A) e histonaSL en la expresión de proteínas a partir del ARNm es específico, se sintetizaron ARNm con secuencias alternativas en combinación con poli(A): Estos ARNm contenían en 3' de A64 una de siete secuencias distintas, respectivamente. Los ARNm que codifican luciferasa o el ARNm de control se electroporaron en células HeLa. Los niveles de luciferasa se midieron a 6, 24, y 48 horas después de la transfección (véase la siguiente Tabla 11 y la Figura 24).

Tabla 11:

ARNm	RLU 6 horas	RLU 24 horas	RLU 48 horas
ppLuc(GC)-ag-A64-N32	33.501	38.979	2.641
ppLuc(GC)-ag-A64-SL	28.176	20.364	874
ppLuc(GC)-ag-A64-U30	41.632	54.676	3.408
ppLuc(GC)-ag-A64-G30	46.763	49.210	3.382
ppLuc(GC)-ag-A64-PolioCL	46.428	26.090	1.655
ppLuc(GC)-ag-A64-aCPSL	34.176	53.090	3.338
ppLuc(GC)-ag-A64-ag	18.534	18.194	989
ppLuc(GC)-ag-A64-histonaSL	282.677	437.543	69.292
ppLuc(GC)-ag-histonaSL	27.597	3.171	0
ppLuc(GC)-ag-A64	14.339	48.414	9.357

15 Tanto una secuencia poli(A) o la histonaSL dieron lugar a niveles de luciferasa comparables. Nuevamente, la combinación de poli(A) e histonaSL incrementó en gran medida el nivel de luciferasa, aumentando por encima del nivel observado con cualquiera de los elementos individuales, actuando así sinérgicamente. En contraste, la combinación de poli(A) con cualquiera de las secuencias alternativas no tuvo efecto en el nivel de luciferasa comparado con el ARNm que contiene solo una secuencia poli(A). De esta manera, la combinación de poli(A) e histonaSL incrementa la expresión de proteínas a partir del ARNm de forma sinérgica, y este efecto es específico.

20 14.5 La combinación de poli(A) e histonaSL incrementa la expresión de proteínas a partir del ARNm de una manera sinérgica in vivo.

25 Para investigar el efecto de la combinación de poli(A) e histonaSL en la expresión de proteínas a partir del ARNm in vivo, los ARNm que codifican luciferasa con diferentes secuencias en 3' de la 3'-UTR de alfa-globina o el ARNm de control se inyectaron intradérmicamente en ratones: los ARNm contenían bien una secuencia A64 poli(A) o una histonaSL en su lugar, o tanto A64A poli(A) como histonaSL en 3' de la 3'-UTR. Los niveles de luciferasa se midieron a 16 horas después de la inyección (véase la siguiente Tabla 12 y la Figura 25).

Tabla 12:

ARNm	RLU 16 horas
ppLuc(GC)-ag-A64-histonaSL	38.081

ppLuc(GC)-ag-histonaSL	137
ppLuc(GC)-ag-A64	4.607

5 La luciferasa se expresó a partir de ARNm que tiene ya sea una histonaSL o una secuencia poli(A). Sorprendentemente, sin embargo, la combinación de poli(A) e histonaSL incrementó en gran medida además el nivel de luciferasa, aumentando por encima del nivel observado con cualquiera de los elementos individuales. La magnitud de la elevación en el nivel de luciferasa debido a la combinación de poli(A) e histonaSL en el mismo ARNm demuestra que están actuando sinérgicamente.

La sinergia entre poli(A) e histonaSL se cuantificó dividiendo la señal de ARNm de poli(A)-histonaSL (+/+) entre la suma de las señales del ARNm de histonaSL (-/+)+ más ARNm de poli(A) (+/-) (véase la siguiente Tabla 13).

Tabla 13:

	A64	histonaSL	RLU 16 horas
	+	+	38.081
	-	+	137
	+	-	4.607
Sinergia			8,0

10

El factor así calculado muestra cuánto más alto es el nivel de luciferasa de ARNm que combina poli(A) e histonaSL de lo que sería esperado si los efectos de poli(A) e histonaSL fueran puramente aditivos. El nivel de luciferasa a partir del ARNm que combina poli(A) e histonaSL fue 8 veces más alto que si los efectos fueran puramente aditivos. Este resultado confirma que la combinación de poli(A) e histonaSL lleva a cabo un incremento notablemente sinérgico en la expresión de proteínas *in vivo*.

15

14.6 La combinación de poli(A) e histonaSL incrementa la expresión de proteína NY-ESO-1 a partir de ARNm

Para investigar el efecto de la combinación de poli(A) e histonaSL en la expresión de proteínas a partir del ARNm, se sintetizaron ARNm que codifican NY-ESO-1 con diferentes secuencias en 3' de la 3'-UTR de alfa-globina: los ARNm contenían bien una secuencia A64 poli(A) o tanto A64 poli(A) como histonaSL en 3' de la 3'-UTR. Los ARNm que codifican NY-ESO-1 se electroporaron en células HeLa. Los niveles de NY-ESO-1 se midieron a 24 horas después de la transfección por citometría de flujo (véase la siguiente Tabla 14 y la Figura 26).

20

Tabla 14:

ARNm	MFI a las 24 horas	
	anti-NY-ESO-1	Control de isotipo
NY-ESO-1(GC)-ag-A64-histonaSL	15.600	1.831
NY-ESO-1(GC)-ag-A64	1.294	849

25

La NY-ESO-1 se expresó a partir del ARNm que tiene solo una secuencia poli(A). Sorprendentemente, sin embargo, la combinación de poli(A) e histonaSL incrementó en gran medida el nivel de NY-ESO-1, aumentando por encima del nivel observado con solo una secuencia poli(A).

14.7 La combinación de poli(A) e histonaSL incrementa el nivel de anticuerpos inducidos por vacunación con ARNm.

Para investigar el efecto de la combinación de poli(A) e histonaSL en la inducción de anticuerpos inducidos por la vacunación con ARNm, los ratones C57BL/6 se vacunaron intradérmicamente con ARNm que codifican NY-ESO-1 en complejo con protamina con diferentes secuencias en 3' de la 3'-UTR de alfa-globina. Los ARNm contenían bien una secuencia A64 poli(A) o tanto A64 poli(A) como histonaSL en 3' de la 3'-UTR. El nivel de los anticuerpos específicos de NY-ESO-1 en los ratones vacunados y de control se analizó por el ELISA con diluciones en serie de los sueros (véase la siguiente Tabla 15 y la Figura 27).

35

Tabla 15:

ARNm	titulación de punto final IgG2a[b] media
NY-ESO-1(GC)-ag-A64-histonaSL	763
NY-ESO-1(GC)-ag-A64	20

La IgG2a[b] anti-NY-ESO-1 se indujo por el ARNm que tiene solo una secuencia de poli(A). Sorprendentemente, sin embargo, la combinación de poli(A) e histonaSL incrementó en gran medida el nivel de IgG2a[b] anti-NY-ESO-1, aumentado por encima del nivel observado con solo una secuencia poli(A).

LISTADO DE SECUENCIAS

<110> CUREVAC GMBH

<120> Ácido nucleico que comprende o codifica un tallo-bucle de histona y una secuencia poli(A) o una señal de poliadenilación para incrementar la expresión de un antígeno tumoral codificado

5 <130> CU01P132WO1EPT1

<140> PCT/EP2012/000674

<141> 15-02-2012

<160> 58

<170> PatentIn versión 3.5

10 <210> 1

<211> 16

<212> ARN

<213> artificial

<220>

15 <223> secuencia de tallo-bucle de histona de conformidad con la fórmula (IC): secuencia consenso de tallo-bucle de histona de metazoarios y protozoarios sin elementos limitantes de tallo

<220>

<221> característica_misc

<222> (1)..(1)

20 <223> n se selecciona de un nucleótido seleccionado de A, U, T, G y C, o un análogo de nucleótido del mismo.

<220>

<221> característica_misc

<222> (3)..(8)

<223> n se selecciona de un nucleótido seleccionado de A, U, T, G y C, o un análogo de nucleótido del mismo.

25 <220>

<221> característica_misc

<222> (10)..(14)

<223> n se selecciona de un nucleótido seleccionado de A, U, T, G y C, o un análogo de nucleótido del mismo.

<220>

30 <221> característica_misc

<222> (16)..(16)

<223> n se selecciona de un nucleótido seleccionado de A, U, T, G y C, o un análogo de nucleótido del mismo.

<400> 1

ngnnnnnnun nnnncn 16

35 <210> 2

<211> 26

<212> ARN

ES 2 739 649 T3

- <213> artificial
- <220>
- <223> secuencia de tallo-bucle de histona de conformidad con la fórmula (Ilc): secuencia consenso de tallo-bucle de histona de metazoarios y protozoarios con elementos limitantes de tallo
- 5 <220>
- <221> característica_misc
- <222> (1)..(6)
- <223> n se selecciona de un nucleótido seleccionado de A, U, T, G y C, o un análogo de nucleótido del mismo.
- <220>
- 10 <221> característica_misc
- <222> (8)..(13)
- <223> n se selecciona de un nucleótido seleccionado de A, U, T, G y C, o un análogo de nucleótido del mismo.
- <220>
- <221> característica_misc
- 15 <222> (15)..(19)
- <223> n se selecciona de un nucleótido seleccionado de A, U, T, G y C, o un análogo de nucleótido del mismo.
- <220>
- <221> característica_misc
- <222> (21)..(26)
- 20 <223> n se selecciona de un nucleótido seleccionado de A, U, T, G y C, o un análogo de nucleótido del mismo.
- <400> 2
- nnnnnngnnn nnnunnnnnc nnnnnn 26
- <210> 3
- <211> 16
- 25 <212> ARN
- <213> artificial
- <220>
- <223> secuencia de tallo-bucle de histona de conformidad con la fórmula (Id): sin elementos limitantes de tallo
- <220>
- 30 <221> característica_misc
- <222> (1)..(1)
- <223> n se selecciona de un nucleótido seleccionado de A, U, T, G y C, o un análogo de nucleótido del mismo.
- <220>
- <221> característica_misc
- 35 <222> (3)..(8)
- <223> n se selecciona de un nucleótido seleccionado de A, U, T, G y C, o un análogo de nucleótido del mismo.

- <220>
<221> característica_misc
<222> (10)..(14)
<223> n se selecciona de un nucleótido seleccionado de A, U, T, G y C, o un análogo de nucleótido del mismo.
- 5 <220>
<221> característica_misc
<222> (16)..(16)
<223> n se selecciona de un nucleótido seleccionado de A, U, T, G y C, o un análogo de nucleótido del mismo.
<400> 3
- 10 ncnnnnnnun nnnngn 16
<210> 4
<211> 26
<212> ARN
<213> artificial
- 15 <220>
<223> secuencia de tallo-bucle de histona de conformidad con la fórmula (IIId): con elementos limitantes de tallo
<220>
<221> característica_misc
<222> (1)..(6)
- 20 <223> n se selecciona de un nucleótido seleccionado de A, U, T, G y C, o un análogo de nucleótido del mismo.
<220>
<221> característica_misc
<222> (8)..(13)
<223> n se selecciona de un nucleótido seleccionado de A, U, T, G y C, o un análogo de nucleótido del mismo.
- 25 <220>
<221> característica_misc
<222> (15)..(19)
<223> n se selecciona de un nucleótido seleccionado de A, U, T, G y C, o un análogo de nucleótido del mismo.
<220>
- 30 <221> característica_misc
<222> (21)..(26)
<223> n se selecciona de un nucleótido seleccionado de A, U, T, G y C, o un análogo de nucleótido del mismo.
<400> 4
nnnnnncnnn nnnunnnng nnnnnn 26
- 35 <210> 5
<211> 16

- <212> ARN
<213> artificial
<220>
<223> secuencia de tallo-bucle de histona de conformidad con la fórmula (Ie): secuencia consenso de tallo-bucle de histona de protozoarios sin elementos limitantes de tallo
- 5 <220>
<221> característica_misc
<222> (3)..(8)
<223> n se selecciona de un nucleótido seleccionado de A, U, T, G y C, o un análogo de nucleótido del mismo.
- 10 <220>
<221> característica_misc
<222> (10)..(14)
<223> n se selecciona de un nucleótido seleccionado de A, U, T, G y C, o un análogo de nucleótido del mismo.
<400> 5
- 15 dgnnnnnnun nnnnch 16
<210> 6
<211> 26
<212> ARN
<213> artificial
- 20 <220>
<223> secuencia de tallo-bucle de histona de conformidad con la fórmula (Ile): secuencia consenso de tallo-bucle de histona de protozoarios con elementos limitantes de tallo
<220>
<221> característica_misc
- 25 <222> (1)..(5)
<223> n se selecciona de un nucleótido seleccionado de A, U, T, G y C, o un análogo de nucleótido del mismo.
<220>
<221> característica_misc
<222> (8)..(13)
- 30 <223> n se selecciona de un nucleótido seleccionado de A, U, T, G y C, o un análogo de nucleótido del mismo.
<220>
<221> característica_misc
<222> (15)..(19)
<223> n se selecciona de un nucleótido seleccionado de A, U, T, G y C, o un análogo de nucleótido del mismo.
- 35 <220>
<221> característica_misc
<222> (22)..(26)

ES 2 739 649 T3

<223> n se selecciona de un nucleótido seleccionado de A, U, T, G y C, o un análogo de nucleótido del mismo.

<400> 6

nnnnndgnnn nnnunnnnnc hnnnnn 26

<210> 7

5 <211> 16

<212> ARN

<213> artificial

<220>

10 <223> secuencia de tallo-bucle de histona de conformidad con la fórmula (If): secuencia consenso de tallo-bucle de histona de metazoarios sin elementos limitantes de tallo

<220>

<221> característica_misc

<222> (1)..(1)

<223> n se selecciona de un nucleótido seleccionado de A, U, T, G y C, o un análogo de nucleótido del mismo.

15 <220>

<221> característica_misc

<222> (3)..(3)

<223> n se selecciona de un nucleótido seleccionado de A, U, T, G y C, o un análogo de nucleótido del mismo.

<220>

20 <221> característica_misc

<222> (7)..(8)

<223> n se selecciona de un nucleótido seleccionado de A, U, T, G y C, o un análogo de nucleótido del mismo.

<220>

<221> característica_misc

25 <222> (10)..(10)

<223> n se selecciona de un nucleótido seleccionado de A, U, T, G y C, o un análogo de nucleótido del mismo.

<220>

<221> característica_misc

<222> (12)..(12)

30 <223> n se selecciona de un nucleótido seleccionado de A, U, T, G y C, o un análogo de nucleótido del mismo.

<220>

<221> característica_misc

<222> (14)..(14)

<223> n se selecciona de un nucleótido seleccionado de A, U, T, G y C, o un análogo de nucleótido del mismo.

35 <220>

<221> característica_misc

ES 2 739 649 T3

<222> (16)..(16)

<223> n se selecciona de un nucleótido seleccionado de A, U, T, G y C, o un análogo de nucleótido del mismo.

<400> 7

ngnbyynnun vndncn 16

5 <210> 8

<211> 26

<212> ARN

<213> artificial

<220>

10 <223> secuencia de tallo-bucle de histona de conformidad con la fórmula (IIf): secuencia consenso de tallo-bucle de histona de metazoarios con elementos limitantes de tallo

<220>

<221> característica_misc

<222> (1)..(6)

15 <223> n se selecciona de un nucleótido seleccionado de A, U, T, G y C, o un análogo de nucleótido del mismo.

<220>

<221> característica_misc

<222> (8)..(8)

<223> n se selecciona de un nucleótido seleccionado de A, U, T, G y C, o un análogo de nucleótido del mismo.

20 <220>

<221> característica_misc

<222> (12)..(13)

<223> n se selecciona de un nucleótido seleccionado de A, U, T, G y C, o un análogo de nucleótido del mismo.

<220>

25 <221> característica_misc

<222> (15)..(15)

<223> n se selecciona de un nucleótido seleccionado de A, U, T, G y C, o un análogo de nucleótido del mismo.

<220>

<221> característica_misc

30 <222> (17)..(17)

<223> n se selecciona de un nucleótido seleccionado de A, U, T, G y C, o un análogo de nucleótido del mismo.

<220>

<221> característica_misc

<222> (19)..(19)

35 <223> n se selecciona de un nucleótido seleccionado de A, U, T, G y C, o un análogo de nucleótido del mismo.

<220>

ES 2 739 649 T3

- <221> característica_misc
<222> (21)..(26)
<223> n se selecciona de un nucleótido seleccionado de A, U, T, G y C, o un análogo de nucleótido del mismo.
<400> 8
- 5 nnnnnngnby ynnunvndnc nnnnnn 26
<210> 9
<211> 16
<212> ARN
<213> artificial
- 10 <220>
<223> secuencia de tallo-bucle de histona de conformidad con la fórmula (I_g): secuencia consenso de tallo-bucle de histona de vertebrados sin elementos limitantes de tallo
<220>
<221> característica_misc
- 15 <222> (1)..(1)
<223> n se selecciona de un nucleótido seleccionado de A, U, T, G y C, o un análogo de nucleótido del mismo.
<220>
<221> característica_misc
<222> (8)..(8)
- 20 <223> n se selecciona de un nucleótido seleccionado de A, U, T, G y C, o un análogo de nucleótido del mismo.
<220>
<221> característica_misc
<222> (16)..(16)
<223> n se selecciona de un nucleótido seleccionado de A, U, T, G y C, o un análogo de nucleótido del mismo.
- 25 <400> 9
nghyydnuh abrdcn 16
<210> 10
<211> 26
<212> ARN
- 30 <213> artificial
<220>
<223> secuencia de tallo-bucle de histona de conformidad con la fórmula (I_{lg}): secuencia consenso de tallo-bucle de histona de vertebrados con elementos limitantes de tallo
<220>
- 35 <221> característica_misc
<222> (1)..(2)
<223> n se selecciona de un nucleótido seleccionado de A, U, T, G y C, o un análogo de nucleótido del mismo.

- <220>
 <221> característica_misc
 <222> (4)..(6)
 <223> n se selecciona de un nucleótido seleccionado de A, U, T, G y C, o un análogo de nucleótido del mismo. <220>
- 5 <220>
 <221> característica_misc
 <222> (13)..(13)
 <223> n se selecciona de un nucleótido seleccionado de A, U, T, G y C, o un análogo de nucleótido del mismo.
 <220>
- 10 <221> característica_misc
 <222> (21)..(25)
 <223> n se selecciona de un nucleótido seleccionado de A, U, T, G y C, o un análogo de nucleótido del mismo
 <400> 10
 nnhnnnghyy ydnuhabrdc nnnnh 26
- 15 <210> 11
 <211> 16
 <212> ARN
 <213> artificial
 <220>
- 20 <223> secuencia de tallo-bucle de histona de conformidad con la fórmula (Ih): secuencia consenso de tallo-bucle de histona humana (Homo sapiens) sin elementos limitantes de tallo
 <400> 11
 dghycudyuh asrrcc 16
 <210> 12
- 25 <211> 26
 <212> ARN
 <213> artificial
 <220>
- 30 <223> secuencia de tallo-bucle de histona de conformidad con la fórmula (IIh): secuencia consenso de tallo-bucle de histona humana (Homo sapiens) con elementos limitantes de tallo
 <220>
 <221> característica_misc
 <222> (1)..(1)
 <223> n se selecciona de un nucleótido seleccionado de A, U, T, G y C, o un análogo de nucleótido del mismo
- 35 <220>
 <221> característica_misc
 <222> (25)..(25)

ES 2 739 649 T3

- <223> n se selecciona de un nucleótido seleccionado de A, U, T, G y C, o un análogo de nucleótido del mismo
- <400> 12
nhaahdghyc udyuhasrrc cvhbnh 26
- <210> 13
- 5 <211> 16
<212> ADN
<213> artificial
<220>
<223> secuencias de tallo-bucle de histona (sin elementos limitantes de tallo) de conformidad con la fórmula (Ic)
- 10 <400> 13
vgyyyyhhth rvrcb 16
- <210> 14
<211> 16
<212> ADN
- 15 <213> artificial
<220>
<223> secuencias de tallo-bucle de histona (sin elementos limitantes de tallo) de conformidad con la fórmula (Ic)
- <400> 14
sgyytytm arrrcs 16
- 20 <210> 15
<211> 16
<212> ADN
<213> artificial
<220>
- 25 <223> secuencias de tallo-bucle de histona (sin elementos limitantes de tallo) de conformidad con la fórmula (Ic)
- <400> 15
sgyyctttm agrrcs 16
- <210> 16
<211> 16
- 30 <212> ADN
<213> artificial
<220>
<223> secuencias de tallo-bucle de histona (sin elementos limitantes de tallo) de conformidad con la fórmula (Ie)
- <220>
- 35 <221> característica_misc
<222> (3)..(5)

ES 2 739 649 T3

- <223> n se selecciona de un nucleótido seleccionado de A, U, T, G y C, o un análogo de nucleótido del mismo
<220>
<221> característica_misc
<222> (7)..(8)
- 5 <223> n se selecciona de un nucleótido seleccionado de A, U, T, G y C, o un análogo de nucleótido del mismo
<220>
<221> característica_misc
<222> (12)..(14)
<223> n se selecciona de un nucleótido seleccionado de A, U, T, G y C, o un análogo de nucleótido del mismo
- 10 <400> 16
dgnnnbnth vnnch 16
<210> 17
<211> 16
<212> ADN
- 15 <213> artificial
<220>
<223> secuencias de tallo-bucle de histona (sin elementos limitantes de tallo) de conformidad con la fórmula (Ie)
<220>
<221> característica_misc
- 20 <222> (3)..(5)
<223> n se selecciona de un nucleótido seleccionado de A, U, T, G y C, o un análogo de nucleótido del mismo
<220>
<221> característica_misc
<222> (13)..(14)
- 25 <223> n se selecciona de un nucleótido seleccionado de A, U, T, G y C, o un análogo de nucleótido del mismo
<400> 17
rgnnnyhbth rdncy 16
<210> 18
<211> 16
- 30 <212> ADN
<213> artificial
<220>
<223> secuencias de tallo-bucle de histona (sin elementos limitantes de tallo) de conformidad con la fórmula (Ie)
<220>
- 35 <221> característica_misc
<222> (3)..(3)

ES 2 739 649 T3

- <223> n se selecciona de un nucleótido seleccionado de A, U, T, G y C, o un análogo de nucleótido del mismo
<220>
<221> característica_misc
<222> (14)..(14)
- 5 <223> n se selecciona de un nucleótido seleccionado de A, U, T, G y C, o un análogo de nucleótido del mismo
<400> 18
rgndbyhyth rdhncy 16
<210> 19
<211> 16
- 10 <212> ADN
<213> artificial
<220>
<223> secuencias de tallo-bucle de histona (sin elementos limitantes de tallo) de conformidad con la fórmula (If)
<400> 19
- 15 vgyyytyhth rvrrcb 16
<210> 20
<211> 16
<212> ADN
<213> artificial
- 20 <220>
<223> secuencias de tallo-bucle de histona (sin elementos limitantes de tallo) de conformidad con la fórmula (If)
<400> 20
sgyycttytm agrrcs 16
<210> 21
- 25 <211> 16
<212> ADN
<213> artificial
<220>
<223> secuencias de tallo-bucle de histona (sin elementos limitantes de tallo) de conformidad con la fórmula (If)
- 30 <400> 21
sgyyctttm agrrcs 16
<210> 22
<211> 16
<212> ADN
- 35 <213> artificial
<220>

ES 2 739 649 T3

- <223> secuencias de tallo-bucle de histona (sin elementos limitantes de tallo) de conformidad con la fórmula (Ig)
<400> 22
ggyycttyth agrcc 16
<210> 23
- 5 <211> 16
<212> ADN
<213> artificial
<220>
<223> secuencias de tallo-bucle de histona (sin elementos limitantes de tallo) de conformidad con la fórmula (Ig)
- 10 <400> 23
ggcyccttytm agrgcc 16
<210> 24
<211> 16
<212> ADN
- 15 <213> artificial
<220>
<223> secuencias de tallo-bucle de histona (sin elementos limitantes de tallo) de conformidad con la fórmula (Ig)
<400> 24
ggctcttttm agrgcc 16
- 20 <210> 25
<211> 16
<212> ADN
<213> artificial
<220>
- 25 <223> secuencias de tallo-bucle de histona (sin elementos limitantes de tallo) de conformidad con la fórmula (Ih)
<400> 25
dghyctdyth asrrcc 16
<210> 26
<211> 16
- 30 <212> ADN
<213> artificial
<220>
<223> secuencias de tallo-bucle de histona (sin elementos limitantes de tallo) de conformidad con la fórmula (Ih)
<400> 26
- 35 ggcyccttth agrgcc 16
<210> 27

ES 2 739 649 T3

- <211> 16
<212> ADN
<213> artificial
<220>
- 5 <223> secuencias de tallo-bucle de histona (sin elementos limitantes de tallo) de conformidad con la fórmula (Ih)
<400> 27
ggcycytttm agrgcc 16<210> 28
<211> 26
<212> ADN
- 10 <213> artificial
<220>
<223> secuencia de tallo-bucle de histona (con elementos limitantes de tallo) de conformidad con la fórmula (IIc)
<220>
<221> característica_misc
- 15 <222> (25)..(26)
<223> n se selecciona de un nucleótido seleccionado de A, U, T, G y C, o un análogo de nucleótido del mismo
<400> 28
hhhhvgyyy yhhthrvrc bvhnn 26
<210> 29
- 20 <211> 26
<212> ADN
<213> artificial
<220>
<223> secuencia de tallo-bucle de histona (con elementos limitantes de tallo) de conformidad con la fórmula (IIc)
- 25 <400> 29
mhmhmsgygy tytmarrcc smchhh 26
<210> 30
<211> 26
<212> ADN
- 30 <213> artificial
<220>
<223> secuencia de tallo-bucle de histona (con elementos limitantes de tallo) de conformidad con la fórmula (IIc)
<400> 30
mmmmmsgyyc tttmagrrc sachmh 26<210> 31
- 35 <211> 26
<212> ADN

- <213> artificial
- <220>
- <223> secuencia de tallo-bucle de histona (con elementos limitantes de tallo) de conformidad con la fórmula (IIe)
- <220>
- 5 <221> característica_misc
- <222> (1)..(5)
- <223> n se selecciona de un nucleótido seleccionado de A, U, T, G y C, o un análogo de nucleótido del mismo
- <220>
- <221> característica_misc
- 10 <222> (8)..(10)
- <223> n se selecciona de un nucleótido seleccionado de A, U, T, G y C, o un análogo de nucleótido del mismo
- <220>
- <221> característica_misc
- <222> (12)..(13)
- 15 <223> n se selecciona de un nucleótido seleccionado de A, U, T, G y C, o un análogo de nucleótido del mismo
- <220>
- <221> característica_misc
- <222> (17)..(19)
- <223> n se selecciona de un nucleótido seleccionado de A, U, T, G y C, o un análogo de nucleótido del mismo
- 20 <220>
- <221> característica_misc
- <222> (22)..(22)
- <223> n se selecciona de un nucleótido seleccionado de A, U, T, G y C, o un análogo de nucleótido del mismo
- <220>
- 25 <221> característica_misc
- <222> (24)..(26)
- <223> n se selecciona de un nucleótido seleccionado de A, U, T, G y C, o un análogo de nucleótido del mismo
- <400> 31
- nnnnndgnnn bnthvnnnc hnhnnn 26
- 30 <210> 32
- <211> 26
- <212> ADN
- <213> artificial
- <220>
- 35 <223> secuencia de tallo-bucle de histona (con elementos limitantes de tallo) de conformidad con la fórmula (IIe)
- <220>

ES 2 739 649 T3

- <221> característica_misc
<222> (1)..(2)
<223> n se selecciona de un nucleótido seleccionado de A, U, T, G y C, o un análogo de nucleótido del mismo
<220>
- 5 <221> característica_misc
<222> (5)..(5)
<223> n se selecciona de un nucleótido seleccionado de A, U, T, G y C, o un análogo de nucleótido del mismo
<220>
- <221> característica_misc
- 10 <222> (8)..(10)
<223> n se selecciona de un nucleótido seleccionado de A, U, T, G y C, o un análogo de nucleótido del mismo
<220>
- <221> característica_misc
<222> (18)..(19)
- 15 <223> n se selecciona de un nucleótido seleccionado de A, U, T, G y C, o un análogo de nucleótido del mismo
<220>
- <221> característica_misc
<222> (25)..(26)
<223> n se selecciona de un nucleótido seleccionado de A, U, T, G y C, o un análogo de nucleótido del mismo
- 20 <400> 32
nnhhnrgnnc yhbthrdnnc ydhnn 26
<210> 33
<211> 26
<212> ADN
- 25 <213> artificial
<220>
<223> secuencia de tallo-bucle de histona (con elementos limitantes de tallo) de conformidad con la fórmula (IIe)
<220>
- <221> característica_misc
- 30 <222> (1)..(1)
<223> n se selecciona de un nucleótido seleccionado de A, U, T, G y C, o un análogo de nucleótido del mismo
<220>
- <221> característica_misc
<222> (8)..(8)
- 35 <223> n se selecciona de un nucleótido seleccionado de A, U, T, G y C, o un análogo de nucleótido del mismo
<220>

ES 2 739 649 T3

<221> característica_misc

<222> (19)..(19)

<223> n se selecciona de un nucleótido seleccionado de A, U, T, G y C, o un análogo de nucleótido del mismo

<400> 33

5 nhhhvrgndb yhythrdhnc yrhhhh 26

<210> 34

<211> 26

<212> ADN

<213> artificial

10 <220>

<223> secuencia de tallo-bucle de histona (con elementos limitantes de tallo) de conformidad con la fórmula (IIf)

<220>

<221> característica_misc

<222> (26)..(26)

15 <223> n se selecciona de un nucleótido seleccionado de A, U, T, G y C, o un análogo de nucleótido del mismo

<400> 34

hhmhmvgyyy tyhthrvrrc bvmhhn 26

<210> 35

<211> 26

20 <212> ADN

<213> artificial

<220>

<223> secuencia de tallo-bucle de histona (con elementos limitantes de tallo) de conformidad con la fórmula (IIf)

<400> 35

25 mmmmsggyyc ttytmagrrc smchhh 26

<210> 36

<211> 26

<212> ADN

<213> artificial

30 <220>

<223> secuencia de tallo-bucle de histona (con elementos limitantes de tallo) de conformidad con la fórmula (IIf)

<400> 36

mmmmmsggyyc tttmagrrc sachmh 26

<210> 37

35 <211> 26

<212> ADN

ES 2 739 649 T3

- <213> artificial
<220>
<223> secuencia de tallo-bucle de histona (con elementos limitantes de tallo) de conformidad con la fórmula (IIg)
<220>
- 5 <221> característica_misc
<222> (24)..(25)
<223> n se selecciona de un nucleótido seleccionado de A, U, T, G y C, o un análogo de nucleótido del mismo
<400> 37
hhmamgggyc ttythagrrc cvhnm 26
- 10 <210> 38
<211> 26
<212> ADN
<213> artificial
<220>
- 15 <223> secuencia de tallo-bucle de histona (con elementos limitantes de tallo) de conformidad con la fórmula (IIg)
<400> 38
hhaamggcyc ttytmagrgc cvchhm 26
<210> 39
<211> 26
- 20 <212> ADN
<213> artificial
<220>
<223> secuencia de tallo-bucle de histona (con elementos limitantes de tallo) de conformidad con la fórmula (IIg)
<400> 39
- 25 mmaamggctc tttmagrgc cmcymm 26
<210> 40
<211> 26
<212> ADN
<213> artificial
- 30 <220>
<223> secuencia de tallo-bucle de histona (con elementos limitantes de tallo) de conformidad con la fórmula (IIh)
<220>
<221> característica_misc
<222> (1)..(1)
- 35 <223> n se selecciona de un nucleótido seleccionado de A, U, T, G y C, o un análogo de nucleótido del mismo
<220>

<221> característica_misc

<222> (25)..(25)

<223> n se selecciona de un nucleótido seleccionado de A, U, T, G y C, o un análogo de nucleótido del mismo

<400> 40

5 nhaahdghyc tdythasrrc cvhbnh 26

<210> 41

<211> 26

<212> ADN

<213> artificial

10 <220>

<223> secuencia de tallo-bucle de histona (con elementos limitantes de tallo) de conformidad con la fórmula (IIh)

<220>

<221> característica_misc

<222> (25)..(25)

15 <223> n se selecciona de un nucleótido seleccionado de A, U, T, G y C, o un análogo de nucleótido del mismo

<400> 41

hhaamggcyc tttthagrc cvmynm 26

<210> 42

<211> 26

20 <212> ADN

<213> artificial

<220>

<223> secuencia de tallo-bucle de histona (con elementos limitantes de tallo) de conformidad con la fórmula (IIh)

<400> 42

25 hmaaaggcyc tttmagrc crmyhm 26

<210> 43

<211> 1747

<212> ARN

<213> artificial

30 <220>

<223> secuencia de ARNm de ppLuc(GC)-ag

<400> 43

ES 2 739 649 T3

gggagaaagc uugaggaugg aggacgcca gaacaucaag aagggcccgg cgcccuucua 60
 cccgcuggag gacgggaccg ccggcgagca gcuccacaag gccaugaagc gguacgcccu 120
 ggugccgggc acgaucgccu ucaccgacgc ccacaucgag gucgacauca ccuacgcgga 180
 guacuucgag augagcgugc gccuggccga ggccaugaag cgguacggcc ugaacaccaa 240
 ccaccggauc guggugugcu cggagaacag ccugcaguuc uucaugccgg ugcugggagc 300
 ccucuucauc ggcguggccg ucgccccggc gaacgacauc uacaacgagc gggagcugcu 360
 gaacagcaug gggaucagcc agccgaccgu gguguucgug agcaagaagg gccugcagaa 420
 gauccugaac gugcagaaga agcugcccau cauccagaag aucaucauca uggacagcaa 480
 gaccgacuac cagggcuucc agucgaugua cacguucgug accagccacc ucccgcggg 540
 cuucaacgag uacgacuucg ucccggagag cuucgaccgg gacaagacca ucgccugau 600
 caugaacagc agcggcagca ccggccugcc gaagggggug gccugccgc accggaccgc 660
 cugcgugcgc uucucgcacg cccgggacc caucuucggc aaccagauca ucccggacac 720
 cgccauccug agcguggugc cguuccacca cggcuucggc auguucacga ccugggcua 780
 ccucaucugc ggcuuuccggg ugguccugau guaccgguuc gaggaggagc uguuccugc 840
 gagccugcag gacuacaaga uccagagcgc gcugcucgug ccgaccucgu ucagcuucuu 900
 cgcaagagc acccugaucg acaaguacga ccugucgaac cugcacgaga ucgccagcgg 960
 gggcgccccg cugagcaagg aggugggcca ggccguggcc aagcgguucc accuccggg 1020
 cauccgccag ggcuaacggc ugaccgagac cacgagcgcg auccugauca cccccgagg 1080
 ggacgacaag ccgggcgccc ugggcaaggu ggucccguuc uucgaggcca agguggugga 1140
 ccuggacacc ggcaagacc uggcgugaa ccagcggggc gagcugugcg ugcgggggccc 1200
 gaugaucaug agcggcuacg ugaacaacc ggaggccacc aacgcccua ucgacaagga 1260
 cggcuggcug cacagcggc acaucgccua cugggacgag gacgagcacu ucuucaucgu 1320
 cgaccggcug aagucgcuga ucaaguacaa gggcuaccag guggcgcgg ccgagcugga 1380
 gagcauccug cuccagcacc ccaacauuu cgacgccggc guggccgggc ugccggacga 1440
 cgacgccggc gagcugccgg ccgcgguggu ggugcuggag cacggcaaga ccaugacgga 1500
 gaaggagauc gucgacuacg uggccagcca ggugaccacc gccagaagc ugcggggcgg 1560
 cgugguguuc guggacgagg ucccgaagg ccugaccggg aagcucgacg cccggaagau 1620
 ccgcgagauc cugaucaagg ccaagaagg cggcaagauc gccguguaag acuaguuaa 1680
 agacugacua gcccgauggg ccucccaacg ggcccuccuc cccuccuugc accgagauua 1740
 auagauc 1747

<210> 44

<211> 1806

<212> ARN

<213> artificial

<220>

ES 2 739 649 T3

<223> secuencia de ARNm de ppLuc(GC)-ag-A64

<400> 44

gggagaaagc uugaggauagg aggacgccaa gaacaucaag aagggcccgg cgcccuucua	60
cccgcuggag gacgggaccg ccggcgagca gcuccacaag gccaugaagc gguacgcccu	120
ggugccgggc acgaucgccu ucaccgacgc ccacaucgag gucgacauca ccuacgcgga	180
guacuucgag augagcgugc gccuggccga ggccaugaag cgguacggcc ugaacaccaa	240
ccaccggauc guggugugcu cggagaacag ccugcaguuc uucaugccgg ugcugggagc	300
ccucuucauc ggcguggccg ucgccccggc gaacgacauc uacaacgagc gggagcugcu	360
gaacagcaug gggaucagcc agccgaccgu gguguucgug agcaagaagg gccugcagaa	420
gauccugaac gugcagaaga agcugcccau cauccagaag aucaucauca uggacagcaa	480
gaccgacuac cagggcuucc agucgaugua cacguucgug accagccacc ucccgcggg	540
cuucaacgag uacgacuucg ucccggagag cuucgaccgg gacaagacca ucgcccugau	600
caugaacagc agcggcagca ccggccugcc gaagggggug gccugccgc accggaccgc	660
cugcgugcgc uucucgcacg cccgggacc caucuucggc aaccagauca ucccggacac	720
cgccauccug agcguugguc cguuccacca cggcuucggc auguucacga ccuugggcu	780
ccucaucugc ggcuuuccggg ugguccugau guaccgguuc gaggaggagc uguuccugcg	840
gagccugcag gacuacaaga uccagagcgc gcugcucgug ccgaccucgu ucagcuucuu	900
cgccaagagc acccugaucg acaaguacga ccugucgaac cugcacgaga ucgcccagcgg	960
gggcgccccg cugagcaagg aggugggca ggccguggcc aagcgguucc accuccggg	1020
cauccgccag ggcuaaggcc ugaccgagac cacgagcgcg auccugauca cccccgagg	1080
cauccgccag ggcuaaggcc ugaccgagac cacgagcgcg auccugauca cccccgagg	1080
ggacgacaag ccgggcgccc ugggcaaggu gguccgguuc uucgaggcca agguggugga	1140
ccuggacacc ggcaagacc ugggcgugaa ccagcggggc gagcugugcg ugcgggggccc	1200
gaugaucaug agcggcuacg ugaacaacc ggaggccacc aacgcccua ucgacaagga	1260
cggcuggcug cacagcggcg acaucgccua cugggacgag gacgagcacu ucuucaucgu	1320
cgaccggcug aagucgcuga ucaaguacaa gggcuaccag guggcgcggc ccgagcugga	1380
gagcauccug cuccagcacc ccaacaucuu cgacgccggc guggccgggc ugccggacga	1440
cgacgccggc gagcugccgg ccgcgguggu ggugcuggag cacggcaaga ccaugacgga	1500
gaaggagauc gucgacuacg uggccagcca ggugaccacc gccagaagc ugcggggcgg	1560
cgugguguuc guggacgagg ucccgaagg ccugaccggg aagcucgacg cccggaagau	1620
ccgcgagauc cugaucaagg ccaagaagg cggcaagauc gccguguaag acuaguuua	1680
agacugacua gcccgauagg ccuuccaacg ggccuccuc ccuuccuugc accgagauua	1740
auaaaaaaaa aaaaaaaaa aaaaaaaaa aaaaaaaaa aaaaaaaaa aaaaaaaaa	1800
aaaaaa	1806

<210> 45

<211> 1772

<212> ARN

<213> artificial

<220>

<223> secuencia de ARNm de ppLuc(GC)-ag-histonaSL

<400> 45

ES 2 739 649 T3

gggagaaagc uugaggaugg aggacgccaa gaacaucaag aagggcccgg cgcccuucua 60
 cccgcuggag gacgggaccg ccggcgagca gcuccacaag gccaugaagc gguacgcccc 120
 ggugccgggc acgaucgccu ucaccgacgc ccacaucgag gucgacauca ccuacgcgga 180
 guacuucgag augagcgugc gccuggccga ggccaugaag cgguacggcc ugaacaccaa 240
 ccaccggauc guggugugcu cggagaacag ccugcaguuc uucaugcccg ugcugggcgc 300
 ccucuucauc ggcguggccg ucgccccggc gaacgacauc uacaacgagc gggagcugcu 360
 gaacagcaug gggaucagcc agccgaccgu gguguucgug agcaagaagg gccugcagaa 420
 gauccugaac gugcagaaga agcugcccau cauccagaag aucaucauca uggacagcaa 480
 gaccgacuac cagggcuucc agucgaugua cacguucgug accagccacc ucccgccggg 540
 cuucaacgag uacgacuucg ucccggagag cuucgaccgg gacaagacca ucgcccugau 600
 caugaacagc agcggcagca ccggccugcc gaagggggug gccugcccgc accggaccgc 660
 cugcugcgc uucucgcacg cccgggacc caucuucggc aaccagauca ucccggacac 720
 cgccaaccug agcggugugc cguuccacca cggcuucggc auguucacga cccugggcu 780
 ccucaucugc ggcuucccgg ugguccugau guaccgguuc gaggaggagc uguuccugcg 840
 gagccugcag gacuacaaga uccagagcgc gcugcugug ccgaccugcu ucagcuucuu 900
 cgccaagagc acccugaucg acaaguacga ccugucgaac cugcacgaga ucgccagcgg 960
 gggcgccccg cugagcaagg aggugggcca ggccguggcc aagcgguucc accucccggg 1020
 cauccgccag ggcuaaggcc ugaccgagac cacgagcgcg auccugauca cccccgaggg 1080
 ggacgacaag ccgggcgccc ugggcaaggu ggucccguuc uucgaggcca agguggugga 1140
 ccuggacacc ggcaagacc ugggcgugaa ccagcggggc gagcugugcg ugcggggccc 1200
 gaugaucaug agcggcuacg ugaacaacc ggaggccacc aacgcccua ucgacaagga 1260
 cggcuggcug cacagcggcg acaucgccua cugggacgag gacgagcacu ucuucaucgu 1320
 cgaccggcug aagucgcuga ucaaguacaa gggcuaccag guggcgcgg ccgagcugga 1380
 gagcauccug cuccagcacc ccaacaucuu cgacgccggc guggccgggc ugccggacga 1440
 cgacgccggc gagcugcccg ccgcgguugu ggugcuggag cacggcaaga ccaugacgga 1500

 gaaggagauc gucgacuacg uggccagcca ggugaccacc gccagaagc ugcggggcgg 1560
 cgugguguuc guggacgagg ucccgaagg ccugaccggg aagcucgacg cccggaagau 1620
 ccgcgagauc cugaucaagg ccaagaagg cggcaagauc gccguguaag acuaguuaa 1680
 agacugacua gcccgauagg ccuccaacg ggccuccuc cccuccuugc accgagaua 1740
 auagaucuca aaggcucuuu ucagagccac ca 1772

<210> 46

<211> 1835

<212> ARN

<213> artificial

ES 2 739 649 T3

<220>

<223> secuencia de ARNm de ppLuc(GC)-ag-A64-histonaSL

<400> 46

```

gggagaaaagc uugaggaugg aggacgccaa gaacaucaag aagggcccgg cgcccuucua      60
cccgcuaggag gacgggaccg cggcgagca gcuccacaag gccaugaagc gguacgcccu      120
ggugccgggc acgaucgccu ucaccgacgc ccacaucgag gucgacauca ccuacgcgga      180
guacuucgag augagcgugc gccuggccga ggccaugaag cgguacggcc ugaacaccaa      240
ccaccggauc guggugugcu cggagaacag ccugcaguuc uucaugccgg ugcuggggcgc      300
ccucuucauc ggcguggccg ucgccccggc gaacgacauc uacaacgagc gggagcugcu      360
gaacagcaug gggaucaagg agccgaccgu gguguucgug agcaagaagg gccugcagaa      420
gauccugaac gugcagaaga agcugcccau cauccagaag aucaucauca uggacagcaa      480
gaccgacuac cagggcuucc agucgaugua cacguucgug accagccacc ucccgccggg      540
cuucaacgag uacgacuucg ucccggagag cuucgaccgg gacaagacca ucgcccugau      600
caugaacagc agcggcagca cggccugcc gaagggggug gccugccgc accggaccgc      660
cugcgugcgc uucucgcacg cccgggacc ccaucucggc aaccagauca ucccggacac      720
cgccauccug agcguggugc cguuccacca cggcuucggc auguucacga cccugggcua      780
ccucaucugc ggcuuuccggg ugguccugau guaccgguuc gaggaggagc uguuccugcg      840
gagccugcag gacuacaaga uccagagcgc gcugcucgug ccgaccugug ucagcuucuu      900
cgccaagagc acccugaucg acaaguacga ccugucgaac cugcacgaga ucgccagcgg      960
gggcgccccg cugagcaagg aggugggcca ggccguggcc aagcgguucc accucccggg     1020
cauccgccag ggcuaaggcc ugaccgagac cacgagcgcg auccugauca cccccgaggg     1080
ggacgacaag ccgggcgccc ugggcaaggu ggucccguuc uucgaggcca agguggugga     1140
ccuggacacc ggcaagacc ugggcgugaa ccagcggggc gagcugugcg ugcggggggc     1200
gaugaucaug agcggcuacg ugaacaaccc ggaggccacc aacgcccua ucgacaagga     1260
cggcuggcug cacagcggcg acaucgccua cugggacgag gacgagcacu ucuucaucgu     1320
cgaccggcug aagucgcuga ucaaguacaa gggcuaccag guggcgccgg ccgagcugga     1380
gagcauccug cuccagcacc ccaacauuu cgacgccggc guggccgggc ugccggacga     1440
cgacgccggc gagcugccgg ccgcgugggu ggugcuggag cacggcaaga ccaugacgga     1500
gaaggagauc gucgacuacg uggccagcca ggugaccacc gccaaagaagc ugcggggcgg     1560
cgugguguuc guggacgagg ucccgaagg ccugaccggg aagcucgacg cccggaagau     1620
ccgcgagauc cugaucaagg ccaagaagg cggcaagauc gccguguaag acuaguuaa     1680
agacugacua gcccgauggg ccuccaacg ggccuccuc cccuccuugc accgagauua     1740
auaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa     1800
aaaaaaaaugca ucaaaggcuc uuuucagagc cacca                                1835

```

<210> 47

<211> 1869

ES 2 739 649 T3

<212> ARN

<213> artificial

<220>

<223> secuencia de ARNm de ppLuc(GC)-ag-A120

<400> 47

gggagaaagc uugaggaugg aggacgcca	gaacaucaag aagggcccgg cgcccuucua	60
cccgcuggag gacgggaccg ccggcgagca	gcuccacaag gccaugaagc gguacgcccu	120
ggugccgggc acgaucgccu ucaccgacgc	ccacaucgag gucgacauca ccuacgcgga	180
guacuucgag augagcgugc gccuggccga	ggccaugaag cgguacggcc ugaacaccaa	240
ccaccggauc guggugugcu cggagaacag	ccugcaguuc uucaugccgg ugcugggcgc	300
ccucuucauc ggcguggccg ucgccccggc	gaacgacauc uacaacgagc gggagcugcu	360
gaacagcaug gggaucagcc agccgaccgu	gguguucgug agcaagaagg gccugcagaa	420
gauccugaac gugcagaaga agcugcccau	cauccagaag aucaucauca uggacagcaa	480
gaccgacuac cagggcuucc agucgaugua	cacguucgug accagccacc ucccgccggg	540
cuucaacgag uacgacuucg ucccggagag	cuucgaccgg gacaagacca ucgcccugau	600
caugaacagc agcggcagca ccggccugcc	gaagggggug gccugccgc accggaccgc	660
cugcgugcgc uucucgcacg cccgggaccc	caucuucggc aaccagauca ucccggacac	720
cgccauccug agcguggugc cguuccacca	cggcuucggc auguucacga ccuugggcu	780
ccucaucugc ggcuuccggg ugguccugau	guaccgguuc gaggaggagc uguuccugcg	840
gagccugcag gacuacaaga uccagagcgc	gcugcucgug ccgaccugcu ucagcuucuu	900
cgccaagagc acccugaucg acaaguacga	ccugucgaac cugcacgaga ucgccagcgg	960
gggcgccccg cugagcaagg aggugggcga	ggccguggcc aagcgguucc accucccggg	1020
cauccgccag ggcuaaggcc ugaccgagac	cacgagcgcg auccugauca cccccgaggg	1080
ggacgacaag ccgggcgccg ugggcaaggu	ggucccguuc uucgaggcca agguggugga	1140
ccuggacacc ggcaagacc ugggcgugaa	ccagcggggc gagcugugcg ugcgggggccc	1200
gaugaucaug agcggcuacg ugaacaacc	ggaggccacc aacgcccua ucgacaagga	1260
cggcuggcug cacagcggcg acaucgccua	cugggacgag gacgagcacu ucuucaucgu	1320

ES 2 739 649 T3

cgaccggcug aagucgcuga ucaaguacaa gggcuaccag guggcgccgg ccgagcugga 1380
gagcauccug cuccagcacc ccaacaucuu cgacgccggc guggccgggc ugccggacga 1440
cgacgccggc gagcugccgg ccgcgguugu ggugcuggag cacggcaaga ccaugacgga 1500
gaaggagauc gucgacuacg uggccagcca ggugaccacc gccaaagaagc ugcggggcgg 1560
cgugguguuc guggacgagg ucccgaagg ccugaccggg aagcucgacg cccggaagau 1620
ccgcgagauc cugaucaagg ccaagaagg cggaagauc gccguguaag acuaguuaua 1680
agacugacua gcccgaugg ccucccaacg ggcccuccuc cccuccuugc accgagauua 1740
auagaucuaa aaaaaaaaa aaaaaaaaa aaaaaaaaa aaaaaaaaa aaaaaaaaa 1800
aaaaaaaaa aaaaaaaaa aaaaaaaaa aaaaaaaaa aaaaaaaaa aaaaaaaaa 1860
aaaaaaaaa 1869

<210> 48

<211> 1858

<212> ARN

5 <213> artificial

<220>

<223> secuencia de ARNm de ppLuc(GC)-ag-A64-ag

<400> 48

gggagaaagc uugaggaugg aggacgcca gaacaucaag aagggcccgg cgcccuucua 60
cccgcuggag gacgggaccg ccggcgagca gcuccacaag gccaugagc gguacgcccu 120
ggugccgggc acgaucgccu ucaccgacgc ccacaucgag gucgacauca ccuacgcgga 180
guacuucgag augagcgugc gccuggccga ggccaugaag cgguacggcc ugaacaccaa 240
ccaccggauc guggugugcu cggagaacag ccugcaguuc uucaugccgg ugcugggcgc 300
ccucuucauc ggcguggccg ucgccccggc gaacgacauc uacaacgagc gggagcugcu 360
gaacagcaug gggaucagcc agccgaccgu gguguucgug agcaagaagg gccugcagaa 420
gauccugaac gugcagaaga agcugcccau cauccagaag aucaucauca uggacagcaa 480
gaccgacuac cagggcuucc agucgaugua cacguucgug accagccacc ucccgcggg 540
cuucaacgag uacgacuucg ucccggagag cuucgaccgg gacaagacca ucgccugau 600
caugaacagc agcggcagca ccggccugcc gaagggggug gccugccgc accggaccgc 660
cugcgugcgc uucucgcacg cccgggaccc caucuucggc aaccagauca ucccggacac 720
cgccauccug agcguuggug cguuccacca cggcuucggc auguucacga cccugggcu 780
ccucaucugc ggcuuuccgg ugguccugau guaccgguuc gaggaggagc uguuuccugc 840
gagccugcag gacuacaaga uccagagcgc gcugcucgug ccgaccugug ucagcuucuu 900
cgccaagagc acccugaucg acaaguacga ccugucgaac cugcacgaga ucgccagcgg 960
gggcgccccg cugagcaagg agguuggcga ggccguggcc aagcgguucc accuccggg 1020
cauccgccag ggcucaggcc ugaccgagac cacgagcgcg auccugauca cccccgagg 1080
10 ggacgacaag ccgggcgccc ugggcaaggu ggucccguuc uucgaggcca agguugguga 1140

ES 2 739 649 T3

ccuggacacc	ggcaagaccc	ugggcgugaa	ccagcggggc	gagcugugcg	ugcggggggc	1200
gaugaucaug	agcggcuacg	ugaacaaccc	ggagggccacc	aacgcccuca	ucgacaagga	1260
cggcuggcug	cacagcggcg	acaucgccua	cugggacgag	gacgagcacu	ucuucaucgu	1320
cgaccggcug	aagucgcuga	ucaaguacaa	gggcuaccag	guggcgccgg	ccgagcugga	1380
gagcauccug	cuccagcacc	ccaacaucuu	cgacgccggc	guggccgggc	ugccggacga	1440
cgacgccggc	gagcugccgg	ccgcgguggu	ggugcuggag	cacggcaaga	ccaugacgga	1500
gaaggagauc	gucgacuacg	uggccagcca	ggugaccacc	gccaaagaagc	ugcggggcg	1560
cgugguguuc	guggacgagg	ucccgaagg	ccugaccggg	aagcucgacg	cccggaagau	1620
ccgcgagauc	cugaucaagg	ccaagaagg	cggcaagauc	gccguguaag	acuaguuua	1680
agacugacua	gcccgauggg	ccucccaacg	ggccuccuc	cccuccuugc	accgagauua	1740
auaaaaaaaa	aaaaaaaaaa	aaaaaaaaaa	aaaaaaaaaa	aaaaaaaaaa	aaaaaaaaaa	1800
aaaaaaugca	uccugcccga	ugggcccucc	aacggggccu	ccuccccucc	uugcaccg	1858

<210> 49

<211> 1894

<212> ARN

<213> artificial

<220>

<223> secuencia de ARNm de ppLuc(GC)-ag-A64-aCPSL

<400> 49

gggagaaagc	uugaggauug	aggacgcca	gaacaucaag	aagggcccgg	cgcccuucua	60
cccgcuggag	gacgggaccg	ccggcgagca	gcuccacaag	gccaugaagc	gguacgcccu	120
ggugccgggc	acgaucgccu	ucaccgacgc	ccacaucgag	gucgacauca	ccuacgcgga	180
guacuucgag	augagcgugc	gccuggccga	ggccaugaag	cgguacggcc	ugaacaccaa	240
ccaccggau	guggugugcu	cggagaacag	ccugcaguuc	uucaugccgg	ugcuggggcg	300
ccucuucauc	ggcguggccg	ucgccccggc	gaacgacauc	uacaacgagc	gggagcugcu	360
gaacagcaug	gggaucagcc	agccgaccgu	gguguucgug	agcaagaagg	gccugcagaa	420
gauccugaac	gugcagaaga	agcugcccac	cauccagaag	aucaucauca	uggacagcaa	480
gaccgacuac	cagggcuucc	agucgaugua	cacguucgug	accagccacc	ucccgccggg	540
cuucaacgag	uacgacuucg	ucccgagag	cuucgaccgg	gacaagacca	ucgcccugau	600
caugaacagc	agcggcagca	ccggccugcc	gaagggggug	gccugccgc	accggaccgc	660
cugcgugcgc	uucucgcacg	cccgggaccc	caucuucggc	aaccagauca	ucccgacac	720

ES 2 739 649 T3

```

cgccauccug agcguggugc cguuccacca cggcuucggc auguucacga cccugggcua      780
ccucaucugc ggcuuccggg ugguccugau guaccgguuc gaggaggagc uguuccugcg      840
gagccugcag gacuacaaga uccagagcgc gcugcucgug ccgaccugu ucagcuucuu      900
cgccaagagc acccugaucg acaaguacga ccugucgaac cugcacgaga ucgccagcgg      960
gggcgccccg cugagcaagg aggugggcga gggcguggcc aagcgguucc accuccggg      1020
cauccgccag ggcuacggcc ugaccgagac cacgagcgcg auccugauca cccccgaggg      1080
ggacgacaag ccgggcgccg ugggcaaggu ggucccguuc uucgaggcca agguggugga      1140
ccuggacacc ggcaagacc uggcgugaa ccagcggggc gagcugugcg ugcggggggc      1200
gaugaucaug agcggcuacg ugaacaacc ggaggccacc aacgcccua ucgacaagga      1260
cggcuggcug cacagcggcg acaucgccua cugggacgag gacgagcacu ucuucaucgu      1320
cgaccggcug aagucgcuga ucaaguacaa gggcuaccag guggcgccgg ccgagcugga      1380
gagcauccug cuccagcacc ccaacaucuu cgacgccggc guggccgggc ugccggacga      1440
cgacgccggc gagcugccgg ccgcgguggu ggugcuggag cacggcaaga ccaugacgga      1500
gaaggagauc gucgacuacg uggccagcca ggugaccacc gccagaagc ugcggggcgg      1560
cgugguguuc guggacgagg ucccgaagg ccugaccggg aagcucgacg cccggaagau      1620
ccgcgagauc cugaucaagg ccaagaagg cggaagauc gccguguaag acuaguuaa      1680
agacugacua gcccgauggg ccucccaacg ggccuccuc cccuccuugc accgagauua      1740
aaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa      1800
aaaaaugca ucaauuccua cacgugaggc gcugugauuc ccuaucccc ucauucccu      1860
auacauuagc acagcgcgau ugcauguagg aaau                                     1894

```

<210> 50

<211> 1909

<212> ARN

<213> artificial

<220>

<223> secuencia de ARNm de ppLuc(GC)-ag-A64-PolioCL

<400> 50

ES 2 739 649 T3

gggagaaagc uugaggauyg aggacgcca gaacaucaag aagggcccgg cgcccuucua 60
 cccgcuggag gacgggaccg ccggcgagca gcuccacaag gccaugaagc gguacgcccu 120
 ggugccgggc acgaucgccu ucaccgacgc ccacaucgag gucgacauca ccuacgcgga 180
 guacuucgag augagcgugc gccuggccga ggccaugaag cgguacggcc ugaacaccaa 240
 ccaccggau c guggugugcu cggagaacag ccugcaguuc uucaugccgg ugcugggagc 300
 ccucuucauc ggcguggccg ucgccccggc gaacgacauc uacaacgagc gggagcugcu 360
 gaacagcaug gggauagacc agccgaccgu gguguucgug agcaagaagg gccugcagaa 420
 gauccugaac gugcagaaga agcugcccau cauccagaag aucaucauca uggacagcaa 480
 gaccgacuac cagggcuucc agucgaugua cacguucgug accagccacc ucccggccggg 540
 cuucaacgag uacgacuucg ucccggagag cuucgaccgg gacaagacca ucgcccugau 600
 caugaacagc agcggcagca ccggccugcc gaagggggug gccugccgc accggaccgc 660
 cugcgugcgc uucucgcacg cccgggaccc caucuucggc aaccagauca ucccggacac 720
 cgccauccug agcguuggugc cguuccacca cggcuucggc auguucacga cccugggcu 780
 ccucaucugc ggcuuccggg ugguccugau guaccgguuc gaggaggagc uguuccugcg 840
 gagccugcag gacuacaaga uccagagcgc gcugcucgug ccgaccucgu ucagcuucuu 900
 cgccaagagc acccugaucg acaaguacga ccugucgaac cugcacgaga ucgcccagcg 960
 gggcgcctcg cugagcaagg aggugggca ggccguggcc aagcgguucc accucccggg 1020
 cauccgccag ggcuaaggcc ugaccgagac cacgagcgcg auccugauca cccccgaggg 1080
 ggacgacaag ccgggcgccc ugggcaaggu ggucccguuc uucgaggcca agguggugga 1140
 ccuggacacc ggcaagacc ugggcgugaa ccagcggggc gagcugugcg ugcgggggccc 1200
 gaugaucaug agcggcuacg ugaacaacc ggaggccacc aacgcccua ucgacaagga 1260
 cggcuggcug cacagcggcg acaucgccua cugggacgag gacgagcacu ucuucaucgu 1320
 cgaccggcug aagucgcuga ucaaguacaa gggcuaccag guggcggcg cccgagcugga 1380
 gagcauccug cuccagcacc ccaacaucuu cgacgccggc guggccgggc ugccggacga 1440
 cgacgccggc gagcugccgg ccgcgguugu ggugcuggag cacggcaaga ccaugacgga 1500
 gaaggagauc gucgacuacg uggccagcca ggugaccacc gccaaagaagc ugcggggcgg 1560
 cgugguguuc guggacgagg ucccgaagg ccugaccggg aagcucgacg cccggaagau 1620
 ccgcgagauc cugaucaagg ccaagaagg cggcaagauc gccguguaag acuaguuaa 1680
 agacugacua gcccgauggg ccuccaacg ggccuccuc cccuccuugc accgagaua 1740
 auaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa 1800
 aaaaaaugca ucaauucuaa aacagcucug ggguuuacc cccccagag gccacgugg 1860
 cggcuaguac uccgguauug cgguacccuu guacgccugu uuuagaaau 1909

<210> 51

<211> 1841

ES 2 739 649 T3

<212> ARN

<213> artificial

<220>

<223> secuencia de ARNm de ppLuc(GC)-ag-A64-G30

<400> 51

```

gggagaaagc uugaggauagg aggacgccaa gaacaucaag aagggcccgg cgcccuucua      60
cccgcuggag gacgggaccg ccggcgagca gcuccacaag gccaugaagc gguacgcccu      120
ggugccgggc acgaucgccu ucaccgacgc ccacaucgag gucgacauca ccuacgcgga      180
guacuucgag augagcgugc gccuggccga ggccaugaag cgguacggcc ugaacaccaa      240
ccaccggauc guggugugcu cggagaacag ccugcaguuc uucaugccgg ugcuggggcg      300
ccucuucauc ggcguggccg ucgccccggc gaacgacauc uacaacgagc gggagcugcu      360
gaacagcaug gggaucagcc agccgaccgu gguguucgug agcaagaagg gccugcagaa      420
gauccugaac gugcagaaga agcugcccau cauccagaag aucaucauca uggacagcaa      480
gaccgacuac cagggcuucc agucgaugua cacguucgug accagccacc ucccggccgg      540
cuucaacgag uacgacuucg ucccggagag cuucgaccgg gacaagacca ucgcccugau      600
caugaacagc agcggcagca ccggccugcc gaagggggug gccugccgc accggaccgc      660
cugcgugcgc uucucgcacg cccgggaccc caucuucggc aaccagauca ucccggacac      720
cgccauccug agcguggugc cguuccacca cggcuucggc auguucacga cccugggcu      780
ccucaucugc ggcuuuccggg ugguuccugau guaccgguuc gaggaggagc uguuuccugc      840
gagccugcag gacuacaaga uccagagcgc gcugcucgug ccgaccucgu ucagcuucuu      900
cgccaagagc acccugaucg acaaguacga ccugucgaac cugcacgaga ucgccagcgg      960
gggcgccccg cugagcaagg aggugggcga ggccguggcc aagcgguucc accuuccggg      1020
cauccgccag ggcuaaggcc ugaccgagac cacgagcgcg auccugauca cccccgaggg      1080
ggacgacaag ccgggcgccg ugggcaaggu ggucccguuc uucgaggcca agguggugga      1140
ccuggacacc ggcaagacc ugggcgugaa ccagcggggc gagcugugcg ugcgggggccc      1200
gaugaucaug agcggcuacg ugaacaaccc ggaggccacc aacgcccua ucgacaagga      1260
cggcuggcug cacagcggcg acaucgccua cugggacgag gacgagcacu ucuucaucgu      1320
cgaccggcug aagucgcuga ucaaguacaa gggcuaccag guggcgccgg ccgagcugga      1380
gagcauccug cuccagcacc ccaacauuu cgacgccggc guggccgggc ugccggacga      1440
cgacgccggc gagcugccgg ccgcgguggu ggugcuggag cacggcaaga ccaugacgga      1500
gaaggagauc gucgacuacg uggccagcca ggugaccacc gccaaagaagc ugcggggcgg      1560
cgugguguuc guggacgagg ucccgaagg ccugaccggg aagcucgacg cccggaagau      1620
ccgcgagauc cugaucaagg ccaagaagg cggcaagauc gccguguaag acuaguuaa      1680
agacugacua gcccgauggg ccuccaacg ggccuccuc cccuccuugc accgagauua      1740

```

ES 2 739 649 T3

auaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa 1800
aaaaaaaaugca uggggggggg gggggggggg gggggggggg g 1841

<210> 52

<211> 1841

<212> ARN

5 <213> artificial

<220>

<223> secuencia de ARNm de ppLuc(GC)-ag-A64-U30

<400> 52

gggagaaagc uugaggauug aggacgcaa gaacaucaag aagggcccgg cgcccuucua 60
cccgcuggag gacgggaccg ccggcgagca gcuccacaag gccaugaagc gguacgcccu 120
ggugccgggc acgaucgccu ucaccgacgc ccacaucgag gucgacauca ccuacgcgga 180
guacuucgag augagcgugc gccuggccga ggccaugaag cgguacggcc ugaacaccaa 240
ccaccggau c guggugugcu cggagaacag ccugcaguuc uucaugccgg ugcugggcgc 300
ccucucauc ggcguggccg ucgccccggc gaacgacauc uacaacgagc gggagcugcu 360
gaacagcaug gggaucagcc agccgaccgu gguguucgug agcaagaagg gccugcagaa 420
gauccugaac gugcagaaga agcugcccau cauccagaag aucaucauca uggacagcaa 480
gaccgacuac cagggcuucc agucgaugua cacguucgug accagccacc ucccggccggg 540
cuucaacgag uacgacuucg ucccggagag cuucgaccgg gacaagacca ucgcccugau 600
caugaacagc agcggcagca ccggccugcc gaagggggug gccugccgc accggaccgc 660
cugcgugcgc uucucgcacg cccgggacct caucuucggc aaccagauca ucccggacac 720
cgccauccug agcugggugc cguuccacca cggcuucggc auguucacga ccuugggcua 780
ccucaucugc ggcuuccggg ugguccugau guaccgguuc gaggaggagc uguuccugcg 840
gagccugcag gacuacaaga uccagagcgc gcugcucgug ccgaccugu ucagcuucuu 900
cgccaagagc acccugaucg acaaguacga ccugucgaac cugcacgaga ucgccagcgg 960
gggcgccccg cugagcaagg aggugggcga ggccguggcc aagcgguucc accucccggg 1020
cauccgccag ggcuaaggcc ugaccgagac cacgagcgcg auccugauca cccccgaggg 1080
ggacgacaag ccgggcgccc ugggcaaggu ggucccguuc uucgaggcca agguggugga 1140
ccuggacacc ggcaagacc ugggcgugaa ccagcggggc gagcugugcg ugcgggggcc 1200
gaugaucaug agcggcuacg ugaacaacc ggaggccacc aacgcccua ucgacaagga 1260
cggcuggcug cacagcggcg acaucgccua cugggacgag gacgagcacu ucuucaucgu 1320

10

ES 2 739 649 T3

cgaccggcug aagucgcuga ucaaguacaa gggcuaccag guggcgccgg ccgagcugga 1380
gagcauccug cuccagcacc ccaacaucuu cgacgccggc guggccgggc ugccggacga 1440
cgacgccggc gagcugccgg ccgcgguugu ggugcuggag cacggcaaga ccaugacgga 1500
gaaggagauc gucgacuacg uggccagcca ggugaccacc gccagaagc ugcggggcgg 1560
cgugguguuc guggacgagg ucccgaagg ccugaccggg aagcucgacg cccggaagau 1620
ccgcgagauc cugaucaagg ccaagaagg cggaagauc gccguguaag acuaguuaua 1680
agacugacua gcccgauggg ccucccaacg ggcccuccuc ccuccuugc accgagauua 1740
aaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa 1800
aaaaaugca uuuuuuuuuu uuuuuuuuuu uuuuuuuuuu u 1841

<210> 53

<211> 1857

5 <212> ARN

<213> artificial

<220>

<223> secuencia de ARNm de ppLuc(GC)-ag-A64-SL

<400> 53

gggagaaagc uugaggaugg aggacgcaa gaacaucaag aagggcccgg cgcccuucua 60
cccgcuggag gacgggaccg ccggcgagca gcuccacaag gccaugaagc gguacgccu 120
ggugccgggc acgaucgcu ucaccgacgc ccacaucgag gucgacauca ccuacgcgga 180
guacuucgag augagcgugc gccuggccga ggccaugaag cgguacggcc ugaacaccaa 240
ccaccggauc guggugugcu cggagaacag ccugcaguuc uucaugccgg ugcugggcgc 300
ccucuucauc ggcguggccg ucgccccggc gaacgacauc uacaacgagc gggagcugcu 360
gaacagcaug gggaucagcc agccgaccgu gguguucgug agcaagaagg gccugcagaa 420

10

ES 2 739 649 T3

gauccugaac gugcagaaga agcugcccau cauccagaag aucaucauca uggacagcaa	480
gaccgacuac cagggcuucc agucgaugua cacguucgug accagccacc ucccgccggg	540
cuucaacgag uacgacuucg ucccggagag cuucgaccgg gacaagacca ugcgccugau	600
caugaacagc agcggcagca ccggccugcc gaagggggug gccugccgc accggaccgc	660
cugcgugcgc uucvcgcacg cccgggaccc caucuucggc aaccagauca ucccggacac	720
cgccauccug agcguugguc cguuccacca cgguucggc auguucacga ccugggcua	780
ccucaucugc ggcuuuccggg ugguuccugau guaccgguuc gaggaggagc uguuccugcg	840
gagccugcag gacuacaaga uccagagcgc gcugcucgug ccgaccugug ucagcuucuu	900
cgccaagagc acccugaucg acaaguacga ccugucgaac cugcacgaga ugcgccagcgg	960
gggcgccccg cugagcaagg aggugggca ggccguggcc aagcgguucc accucccggg	1020
cauccgccag ggcuaaggcc ugaccgagac cacgagcgcg auccugauca cccccgaggg	1080
ggacgacaag ccgggcgccg ugggcaaggu ggucccguuc uucgaggcca agguggugga	1140
ccuggacacc ggcaagacc ugggcgugaa ccagcggggc gagcugugcg ugcgggggcc	1200
gaugaucaug agcggcuacg ugaacaacc ggaggccacc aacgcccua ucgacaagga	1260
cggcuggcug cacagcggcg acaucgccua cugggacgag gacgagcacu ucuucaucgu	1320
cgaccggcug aagucgcuga ucaaguacaa gggcuaccag guggcgccgg ccgagcugga	1380
gagcauccug cuccagcacc ccaacaucuu cgacgccggc guggccgggc ugccggacga	1440
cgacgccggc gagcugccgg ccgcgguggu ggugcuggag cacggcaaga ccaugacgga	1500
gaaggagauc gucgacuacg uggccagcca ggugaccacc gccagaagc ugcggggcgg	1560
cgugguguuc guggacgagg ucccgaagg ccugaccggg aagcucgacg cccggaagau	1620
ccgcgagauc cugaucaagg ccaagaagg cggaagauc gccguguaag acuaguuaa	1680
agacugacua gcccgauggg ccucccaacg ggccuccuc cccuccuugc accgagauua	1740
aaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa	1800
aaaaaaugca uuauggcggc cguguccacc acggauauca ccguggugga cgcgcc	1857

<210> 54

<211> 1838

<212> ARN

<213> artificial

<220>

<223> ppLuc(GC)-ag-A64-N32

<400> 54

ES 2 739 649 T3

gggagaaagc uugaggaugg aggacgcca gaacaucaag aagggcccgg cgcccuucua 60
 cccgcuggag gacgggaccg ccggcgagca gcuccacaag gccaugaagc gguacgcccu 120
 ggugccgggc acgaucgccu ucaccgacgc ccacaucgag gucgacauca ccuacgcgga 180
 guacuucgag augagcgugc gccuggccga ggccaugaag cgguacggcc ugaacaccaa 240
 ccaccggauc guggugugcu cggagaacag ccugcaguuc uucaugccgg ugcugggcgc 300
 ccucuucauc ggcguggccg ucgccccggc gaacgacauc uacaacgagc gggagcugcu 360
 gaacagcaug gggaucagcc agccgaccgu gguguucgug agcaagaagg gccugcagaa 420
 gauccugaac gugcagaaga agcugcccau cauccagaag aucaucauca uggacagcaa 480
 gaccgacuac cagggcuucc agucgaugua cacguucgug accagccacc ucccgccggg 540
 cuucaacgag uacgacuucg ucccggagag cuucgaccgg gacaagacca ucgcccugau 600
 caugaacagc agcggcagca ccggccugcc gaagggggug gccugccgc accggaccgc 660
 cugcgugcgc uucucgcacg cccgggacc ccaucucggc aaccagauca ucccggacac 720
 cgccauccug agcguugguc cguuccacca cggcuucggc auguucacga cccugggcua 780
 ccuauvcugc ggcuuccggg ugguccugau guaccgguuc gaggaggagc uguuccugcg 840
 gagccugcag gacuacaaga uccagagcgc gcugcucgug ccgaccugcu ucagcuucuu 900
 cgccaagagc acccugaucg acaaguacga ccugucgaac cugcacgaga ucgcccagcgg 960
 gggcgccccg cugagcaagg agguuggcga ggccguggcc aagcgguucc accucccggg 1020
 cauccgccag ggcuaaggcc ugaccgagac cacgagcgcg auccugauca cccccgaggg 1080
 ggacgacaag ccgggcgccc ugggcaaggu ggucccguuc uucgaggcca agguuggugga 1140
 ccuggacacc ggcaagacc ugggcgugaa ccagcggggc gagcugugcg ugcggggggc 1200
 gaugaucaug agcggcuacg ugaacaacc ggaggccacc aacgcccua ucgacaagga 1260
 cggcuggcug cacagcggcg acaucgccua cugggacgag gacgagcacu ucuucaucgu 1320
 cgaccggcug aagucgcuga ucaaguacaa gggcuaccag guggcgcgg ccgagcugga 1380
 gagcauccug cuccagcacc ccaacaucuu cgacgccggc guggccgggc ugccggacga 1440
 cgacgccggc gagcugccgg ccgcguggu ggugcuggag cacggcaaga ccaugacgga 1500
 gaaggagauc gucgacuacg uggccagcca ggugaccacc gccagaagc ugcggggcgg 1560
 cgugguguuc guggacgag ucccgaagg ccugaccggg aagcucgacg cccggaagau 1620
 ccgcgagauc cugaucaagg ccaagaagg cggcaagauc gccuguaag acuaguuaa 1680
 agacugacua gcccgauggg ccucccaacg ggccuccuc cccuccuugc accgagauua 1740
 auaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa 1800
 aaaaaaugca uccccucua gacaauugga auuccaua 1838

<210> 55

<211> 747

<212> ARN

<213> artificial

ES 2 739 649 T3

<220>

<223> secuencia de ARNm de NY-ESO-1(GC)-ag-A64-c30

<400> 55

	gggagaaagc uuaccaugca ggccgagggc cgcggcaccg gcggcucgac cggcgacgcc	60
	gacgggcccc gcggccccggg caucccggac ggccccggcg ggaacgcggg cggccccggc	120
	gaggccggcg ccaccggcg gcggggcccc cggggcgccg gcgccgccg ggcgagcggc	180
	ccccggcggg gcgccccgcg gggcccgcac ggcggcgccg ccagcggccu gaacgggugc	240
	ugccggugcg gcgcccgcg cccggagagc cggcuccugg aguucuccu ggccaugccg	300
	uucgcgacc cgauggagg cgagcuggcc cggcggagcc uggcccagga cggccccgcg	360
	cugcccugc cgggcgugcu ccugaaggag uucacgguga gcggcaacau ccugaccauc	420
	cggcugacc cgcggacca ccggcagcug cagcugucga ucagcagcug ccuccagcag	480
	cugagccugc ugauguggau caccagcugc uuccugccg uguuccuggc ccagccgcc	540
	agcggccagc gccggugacc acuaguuaa agacugacua gcccgauggg ccuccaacg	600
	ggccuccuc ccucuccugc accgagauua auaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa	660
	aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaauuu ccccccccc ccccccccc	720
5	cccccccccc ucuagacaau uggaauu	747

<210> 56

<211> 761

<212> ARN

<213> artificial

10 <220>

<223> secuencia de ARNm de NY-ESO-1(GC)-ag-A64-c30-histonaSL

<400> 56

ES 2 739 649 T3

gggagaaagc uuaccaugca ggcccagggc cgcggcaccg gcggcucgac cggcgacgcc 60
 gacgggcccg gcggcccggg caucccggac ggcccgggcg ggaacgcggg cggcccgggc 120
 gaggccggcg ccaccggcg gcggggcccg cggggcgccg gcgccgcccg ggcgagcggc 180
 cccggcgggg gcgccccgcg gggcccgcac ggcggcgccg ccagcggccu gaacgggugc 240
 ugccggugcg gcgcccgcgg cccggagagc cggcuccugg aguucuaacu ggccaugccg 300
 uucgcgacc cgauggaggc cgagcuggcc cggcggagcc uggcccagga cgccccgccc 360
 cugcccgugc cgggcgugcu ccugaaggag uucacgguga gcggcaacau ccugaccauc 420
 cggcugaccg ccgcgaccac ccggcagcug cagcugucga ucagcagcug ccuccagcag 480
 cugagccugc ugauguggau caccagugc uuccugccgg uguuccuggc ccagccgccc 540
 agcggccagc gccggugacc acuaguuaa agacugacua gcccgauagg ccucccaacg 600
 ggccuccuc cccuccuugc accgagaua auaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa 660
 aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaugca ucccccccc ccccccccc 720
 ccccccccc ccaaaggcuc uuuucagagc caccaggaau u 761

<210> 57

<211> 646

<212> ARN

5 <213> artificial

<220>

<223> secuencia de ARNm de survivina(GC)-ag-A64-C30-histonaSL

<400> 57

gggagaaagc uuaccauggg cccccacc cugccgcccg ccuggcagcc guuccucaag 60
 gaccaccgca ucucgaccuu caagaacugg ccguuccugg agggcugcgc gugcaccccc 120
 gagcggauug ccgaggcccg cuucauccac ugccccaccg agaacgagcc ggaccuggcc 180
 cagugcuucu ucugcuuca ggagcuggag ggcugggagc cggacgacga cccgaucgag 240
 gagcacaaga agcacagcag cggcugcgcc uuccugagcg ugaagaagca guucgaggag 300
 cugacgcucg gggaguuccu gaagcuggac cgggagcggg ccaagaaca gaucgcgaag 360
 gagaccaaca acaagaagaa ggaguucgag gagaccgcca agaaggugcg gcgggccauc 420
 gagcagcugg ccgccaugga cugaccacua guuuaaagac ugacuagccc gaugggccuc 480
 ccaacgggccc cuccuccccu ccuugcaccg agauuaaua aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa 540
 aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaugcaucc ccccccccc 600
 ccccccccc cccccccaa aggcucuuuu cagagccacc agaauu 646

10

<210> 58

<211> 1813

ES 2 739 649 T3

<212> ARN

<213> artificial

<220>

<223> secuencia de ARNm de MAGE-C1(GC)-ag-A64-c30-histonaSL

<400> 58

```

gggagaaagc uuaccaugca guccccgcug cagggcgagg aguuccagag cuccccugcag      60
agccccgugu ccaucugcag cuccagcacc ccuccagacc ucccgcagag cucccccgag      120
uccagccagu ccccccccga gggcccgguc cagagccccu ugcacucucc gcagagcccc      180
ccggagggga ugcacucucc gagccccugc cagucucccg agagcgcccc cgagggcgag      240
gacucccuca gcccgcugca gauccccag uccccgcugg agggggagga cagccucucc      300
agccugcacu uccccaguc cccgcccag ugggaggaca gccugagccc ccuccacuuc      360
ccccaguucc cgccccaggg cgaggacuuc caguccagcc ugcagucucc cgugagcauc      420
ugcuccagcu ccacgagccu guccucucc cagagcuucc cggagucucc ccagagcccg      480
cccgaggggc cggcgcaguc cccccugcag cgccccguga gcuccuucuu cagcuacacc      540
cuggccuccc uccugcagag cuccacgag agcccgcaga gcccgcccga gggccccgcc      600
cagucuccgc ugcagagccc cgucuccagc uccccucca gcaccuccag cuccucagc      660
caguccagcc ccguguccag cuccccgucc agcaccucca gcucccugag caagagcucc      720
cccgagagcc cccugcaguc ccccgugauc agcuucucca gcuccacgag ccucucuccg      780
uucagcgagg aguuccagcuc ccccgucgac gaguacacca gcuccagcga caccucugcug      840
gaguccgaca gccucaccga cuccgagagc cugaucgaga gcgagcccu guuaccuac      900
acgcucgacg agaaggugga cgagcuggcc cgguuccugc uccugaagua ccaggugaag      960
cagcccunca ccaaggccga gaugcugacc aacguaucu cccgcuacac cggcuacuuc     1020
ccggugaucu uccggaaggc gcgcgaguuc aucgagaucc ucuucgggau cagccugcgg     1080
gagguggacc ccgacgacuc cuacgucuuc gugaacacgc uggaccucac cagcgagggc     1140

```

ES 2 739 649 T3

ugccuguccg	acgagcaggg	gaugagccag	aaccgccugc	ucauccugau	ccuguccauc	1200
aucuucauca	agggcaccua	cgccagcgag	gaggucaucu	gggacgugcu	cuccgggauc	1260
ggcgugcggg	ccggccgcga	gcacuucgcc	uucggggagc	cccgggagcu	gcugaccaag	1320
gucugggugc	aggagcacua	ccucgaguac	cgcgaggugc	ccaacagcuc	cccgccccgg	1380
uacgaguucc	uguggggccc	ccgcgcccac	agcgagguca	ucaagcggaa	ggugguggag	1440
uuccuggcga	ugcucaagaa	cacggucccc	aucaccuucc	cguccagcua	caaggacgcc	1500
cugaaggacg	uggaggagcg	ggcccaggcc	aucaucgaca	ccaccgacga	cuccacggcc	1560
accgagagcg	cguccagcuc	cgugaugagc	cccagcuucu	ccagcgagug	accacuaguu	1620
auaagacuga	cuagcccgau	gggccuccca	acgggcccuc	cucuccuccu	ugcaccgaga	1680
uuauaaaaa	aaaaaaaaa	aaaaaaaaa	aaaaaaaaa	aaaaaaaaa	aaaaaaaaa	1740
aaaaaaaaau	gcaucccccc	cccccccccc	cccccccccc	cccccaaagg	cucuuuucag	1800
agccaccaga	auu					1813

REIVINDICACIONES

1. Kit o kit de partes que comprende:

A) un ácido nucleico que comprende o codifica para una región codificante, donde la región codificante codifica al menos un péptido o proteína, que comprende el antígeno tumoral NY-ESO-1 o un fragmento del mismo;

5 B) un ácido nucleico que comprende o codifica para una región codificante, donde la región codificante codifica al menos un péptido o proteína, que comprende el antígeno tumoral 5T4 o un fragmento del mismo;

C) un ácido nucleico que comprende o codifica para una región codificante, donde la región codificante codifica al menos un péptido o proteína, que comprende el antígeno tumoral survinina o un fragmento del mismo;

10 D) un ácido nucleico que comprende o codifica para una región codificante, donde la región codificante codifica al menos un péptido o proteína, que comprende el antígeno tumoral MAGE-C1 o un fragmento del mismo;

E) un ácido nucleico que comprende o codifica para una región codificante, donde la región codificante codifica al menos un péptido o proteína, que comprende el antígeno tumoral MAGE-C2 o un fragmento del mismo;

donde el fragmento de NY-ESO-1, 5T4, survinina, MAGE-C1 o MAGE-C2 tiene una longitud de al menos seis residuos aminoácidos;

15 donde cada secuencia de ácido nucleico A, B, C, D o E, en la dirección 5' a 3', comprende o codifica para

i)

- a) la región codificante
- b) al menos un tallo-bucle de histona, y
- c) una secuencia poli(A);

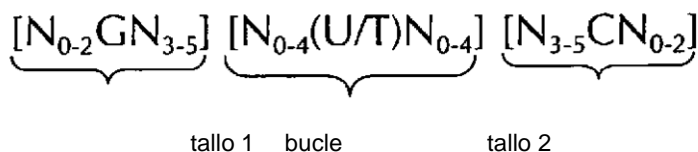
20 o

ii)

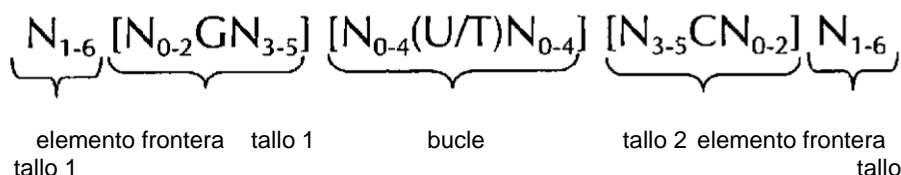
- a) la región codificadora
- b) una secuencia poli(A); y
- c) al menos un tallo-bucle de histona;

25 donde el al menos un tallo-bucle de histona en i) o ii) se selecciona de las fórmulas (I) o (II)

fórmula (I) (secuencia tallo-bucle sin elementos frontera de tallo):



fórmula (II) (secuencia de tallo-bucle con elementos frontera de tallo):



30

donde:

35 los elementos frontera N_{1-6} de tallo 1 o tallo 2 es una secuencia consecutiva de 1 a 6, de manera preferente de 2 a 6, de manera más preferente de 2 a 5, aún de manera más preferente de 3 a 5, de manera mucho más preferente de 4 a 5 o 5 N, donde cada N se selecciona independientemente de un nucleótido seleccionado de A, U, T, G y C, o un análogo de nucleótido del mismo;

- tallo 1 [N₀₋₂GN₃₋₅] es una complementariedad inversa o complementariedad parcialmente inversa con el elemento tallo 2, y es una secuencia consecutiva de entre 5 a 7 nucleótidos; donde N₀₋₂ es una secuencia consecutiva de 0 a 2, de manera preferente de 0 a 1, de manera más preferente de 1 N, en donde cada N se selecciona independientemente de un nucleótido seleccionado de A, U, T, G y C o un análogo de nucleótido del mismo; donde
- 5 N₃₋₅ es una secuencia consecutiva de 3 a 5, de manera preferente de 4 a 5, de manera más preferente de 4 N, en donde cada N se selecciona independientemente de otro de un nucleótido seleccionado de A, U, T, G y C o un análogo de nucleótido del mismo, y donde G es guanosina o un análogo de la misma, y se puede reemplazar opcionalmente por una citidina o un análogo de la misma, con la condición de que su citidina de nucleótido complementaria en el tallo 2 se reemplace por guanosina;
- 10 la secuencia de bucle [N₀₋₄(U/T)N₀₋₄] se sitúa entre los elementos tallo 1 y tallo 2, y es una secuencia consecutiva de 3 a 5 nucleótidos, de manera más preferente de 4 nucleótidos; donde cada N₀₋₄ es independientemente una secuencia consecutiva de 0 a 4, de manera preferente de 1 a 3, de manera más preferente de 1 a 2 N, en donde cada N se selecciona independientemente de otro de un nucleótido seleccionado de A, U, T, G y C o un análogo de nucleótido del mismo; y donde U/T representa uridina, u opcionalmente timidina;
- 15 tallo 2 [N₃₋₅CN₀₋₂] es complementariedad inversa o complementariedad parcialmente inversa con el elemento tallo 1 y es una secuencia consecutiva entre 5 a 7 nucleótidos; donde N₃₋₅ es una secuencia consecutiva de 3 a 5, de manera preferente de 4 a 5, de manera más preferente de 4 N, en donde cada N se selecciona independientemente de un nucleótido seleccionado de A, U, T, G y C o un análogo de nucleótido del mismo; donde N₀₋₂ es una secuencia consecutiva de 0 a 2, de manera preferente de 0 a 1, de manera más preferente de 1 N, en donde cada N se
- 20 selecciona independientemente de un nucleótido seleccionado de A, U, T, G o C o un análogo de nucleótido del mismo; y donde C es citidina o un análogo de la misma, y se puede reemplazar opcionalmente por una guanosina o un análogo de la misma con la condición de que su guanosina de nucleótido complementaria en el tallo 1 se reemplace por citidina;
- donde
- 25 tallo 1 y tallo 2 son capaces de un emparejamiento de bases entre sí formando una secuencia complementaria inversa, donde el emparejamiento de bases puede presentarse entre el tallo 1 y tallo 2, o formando una secuencia complementaria parcialmente inversa, donde un emparejamiento de bases incompleto puede presentarse entre tallo 1 y tallo 2, y
- donde el al menos un tallo-bucle de histona se une a un tallo-bucle de una proteína de enlace (SLBP); y
- 30 donde cada ácido nucleico A, B, C, D o E además comprende o codifica para una secuencia poli(C) que comprende al menos 10 nucleótidos citidina.
2. Kit o kit de partes según la reivindicación 1, que además comprende un ácido nucleico que comprende o codifica para una región codificante que codifica un antígeno tumoral, donde el antígeno tumoral es un antígeno específico de melanocitos, un antígeno cáncer-testis o un antígeno específico de tumor, preferentemente un antígeno CT-X, un antígeno CT no X, una pareja de unión para un antígeno CT-X o una pareja de unión para un antígeno CT-no X o un antígeno tumoral, más preferiblemente un antígeno CT-X, una pareja de unión para un antígeno CT-no X o un antígeno tumoral específico o un fragmento de dicho antígeno tumoral, donde el fragmento tiene una longitud de al menos seis residuos aminoácidos.
- 35
3. Kit o kit de partes según la reivindicación 1 o 2, que además comprende un ácido nucleico que comprende o codifica para una región codificante que codifica un antígeno tumoral, donde el antígeno tumoral se selecciona de la lista de: 707-AP, 9D7, AFP, AlbZIP HPG1, alfa-5-beta-1-integrina, alfa-5-beta-6-integrina, alfa-actinin-4/m, alfa-metilacil-coenzima A racemasa, ART-4, ARTC1/m, B7H4, BAGE-1, BCL-2, bcr/abl, beta-catenina/m, BING-4, BRCA1/m, BRCA2/m, CA 15-3/CA 27-29, CA 19-9, CA72-4, CA125, calreticulina, CAMEL, CASP-8/m, catepsina B, catepsina L, CD19, CD20, CD22, CD25, CDE30, CD33, CD4, CD52, CD55, CD56, CD80, CDC27/m, CDK4/m,
- 45 CDKN2A/m, CEA, CLCA2, CML28, CML66, COA-1/m, proteína similar a coactosina, collage XXIII, COX-2, CT-9/BRD6, Cten, ciclina B1, ciclina D1, cyp-B, CYPB1, DAM-10, DAM-6, DEK-CAN, EFTUD2/m, EGFR, ELF2/m, EMMPRIN, EpCam, EphA2, EphA3, ErbB3, ETV6-AML1, EZH2, FGF-5, FN, Frau-1, G250, GAGE-1, GAGE-2, GAGE-3, GAGE-4, GAGE-5, GAGE-6, GAGE7b, GAGE-8, GDEP, GnT-V, gp100, GPC3, GPNMB/m, HAGE, HAST-2, hepsina, Her2/neu, HERV-K-MEL, HLA-A*0201-R17I, HLA-A11/m, HLA-A2/m, HNE, homeosecuencia NKX3.1, HOM-TES-14/SCP-1, HOM-TES-85, HPV-E6, HPV-E7, HSP70-2M, HST-2, hTERT, iCE, IGF-1R, IL-13Ra2, IL-2R, IL-5, receptor de laminina inmadura, calicreína-2, calicreína-4, Ki67, KIAA0205, KIAA0205/m, KK-LC-1, K-Ras/m, LAGE-A1, LDLR-FUT, MAGE-A1, MAGE-A2, MAGE-A3, MAGE-A4, MAGE-A6, MAGE-A9, MAGE-A10, MAGE-A12, MAGE-B1, MAGE-B2, MAGE-B3, MAGE-B4, MAGE-B5, MAGE-B6, MAGE-B10, MAGE-B16, MAGE-B17, MAGE-C1, MAGE-C2, MAGE-C3, MAGE-D1, MAGE-D2, MAGE-D4, MAGE-E1, MAGE-E2, MAGE-F1, MAGE-H1, MAGEL2, mamaglobina A, MART-1/melan-A, MART-2, MART-2/m, proteína de matriz 22, MC1R, M-CSF, ME1/m, mesotelina, MG50/PXDN, MMP11, antígeno MN/CA IX, MRP-3, MUC-1, MUC-2, MUM-1/m, MUM-2/m, MUM-3/m, miosina clase I/m, NA88-A, N-acetilglucosaminiltransferasa-V, Neo-PAP, Neo-PAP/m, NFYC/m,
- 55

NGEP, NMP22, NPM/ALK, N-Ras/m, NSE, NY-ESO-B, NY-ESO-1, OA1, OFA-iLRP, OGT, OGT/m, OS-9, OS-9/m, osteocalcina, osteopontina, p15, bcr-abl menor p190, p53, p53/m, PAGE-4, PAI-1, PAI-2, PAP, PART-1, PATE, PDEF, Pim-1-Quinasa, Pin-1, Pml/PARalfa, POTE, PRAME, PRDX5/m, prosteína, proteinasa-3, PSA, PSCA, PSGR, PSM, PSMA, PTPRK/m, RAGE-1, RBAF600/m, RHAMM/CD168, RU1, RU2, S-100, SAGE, SART-1, SART-2, SART-3, SCC, SIRT2/m, Sp17, SSX-1, SSX-2/HOM-MEL-40, SSX-4, STAMP-1, STEAP-1, survivina, survivina-2B, SYT-SSX-1, SYT-SSX-2, TA-90, TAG-72, TARP, TEL-AML1, TGFbeta, TGFbetaRII, TGM-4, TPI/m, TRAG-3, TRG, TRP-1, TRP-2/6b, TRP/INT2, TRP-p8, tirosinasa, UPA, VEGFR1, VEGFR-2/FLK-1, WT1 y un idiotipo de inmunoglobulina de una célula sanguínea linfoide o un idiotipo de un receptor de células T de una célula sanguínea linfoide, o un fragmento de dicho antígeno tumoral, donde el fragmento tiene una longitud de al menos seis residuos aminoácidos.

5

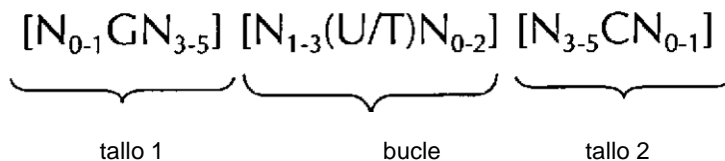
10

15

20

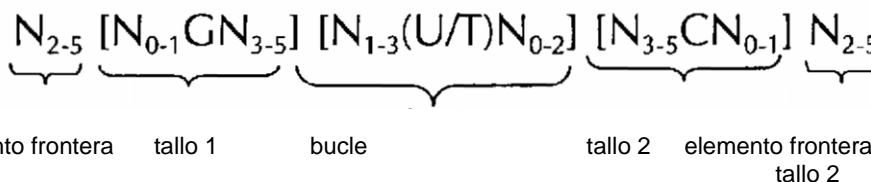
4. Kit o kit de partes según las reivindicaciones 1 a 3, donde el al menos un tallo-bucle de histona es heterólogo a la región codificadora, preferentemente donde la región codificadora no codifica una proteína de histona o un fragmento, derivado o variante de la misma que tiene una función similar a histona.
5. Kit o kit de partes de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, donde la región codificadora no codifica una proteína reporter o una proteína marcadora o de selección, donde la proteína reporter, la proteína marcadora o de selección no es NY-ESO-1, 5T4, survivina, MAGE-C1, MAGE-C2 o un antígeno tumoral como se define según la reivindicación 2 o 3.
6. Kit o kit de partes según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, donde el ácido nucleico es un ARN, preferentemente un ARNm.
7. Kit o kit de partes según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, donde el al menos un tallo-bucle de histona se selecciona de al menos una de las siguientes fórmulas (Ia) o (IIa):

fórmula (Ia) (secuencia tallo-bucle sin elementos frontera de tallo):



25

fórmula (IIa) (secuencia tallo-bucle con elementos frontera de tallo):



30

35

40

8. Kit o kit de partes según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, donde la secuencia poli(A) comprende una secuencia de aproximadamente 25 a aproximadamente 400 nucleótidos de adenosina, preferentemente una secuencia de aproximadamente 50 a aproximadamente 400 nucleótidos de adenosina, de manera más preferente una secuencia de aproximadamente 50 a aproximadamente 300 nucleótidos de adenosina, de manera más preferente una secuencia de aproximadamente 50 a aproximadamente 250 nucleótidos de adenosina, de manera mucho más preferente una secuencia de aproximadamente 60 a aproximadamente 250 nucleótidos de adenosina.
9. Kit o kit de partes según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, donde el ácido nucleico es un ácido nucleico modificado, en particular un ácido nucleico estabilizado.
10. Kit o kit de partes según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9, donde el ácido nucleico C consiste en un ácido nucleico de acuerdo con la SEQ ID NO 57 y/o el ácido nucleico D consiste en un ácido nucleico de acuerdo con la SEQ ID NO 58.
11. Composición que comprende los ácidos nucleicos tal como se definen en cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10 en relación al kit o kit de partes.
12. Kit o kit de partes según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10, comprendiendo el kit o kit de partes:

A) un ácido nucleico que comprende o codifica para una región codificante, donde la región codificante codifica al menos un péptido o proteína, que comprende el antígeno tumoral NY-ESO-1 o un fragmento del mismo;

B) un ácido nucleico que comprende o codifica para una región codificante, donde la región codificante codifica al menos un péptido o proteína, que comprende el antígeno tumoral 5T4 o un fragmento del mismo;

5 C) un ácido nucleico que comprende o codifica para una región codificante, donde la región codificante codifica al menos un péptido o proteína, que comprende el antígeno tumoral survivina o un fragmento del mismo;

D) un ácido nucleico que comprende o codifica para una región codificante, donde la región codificante codifica al menos un péptido o proteína, que comprende el antígeno tumoral MAGE-C1 o un fragmento del mismo;

10 E) un ácido nucleico que comprende o codifica para una región codificante, donde la región codificante codifica al menos un péptido o proteína, que comprende el antígeno tumoral MAGE-C2 o un fragmento del mismo;

donde el fragmento de NY-ESO-1, 5T4, survivina, MAGE-C1 o MAGE-C2 tiene una longitud de al menos seis residuos aminoácidos;

donde cada secuencia de ácido nucleico A, B, C, D o E, en la dirección 5' a 3', comprende o codifica para

i)

- 15 a) la región codificante
b) al menos un tallo-bucle de histona, y
c) una secuencia poli(A);

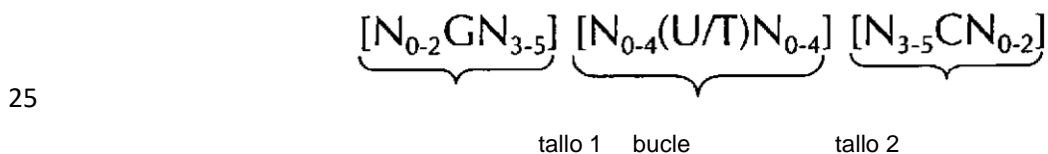
o

ii)

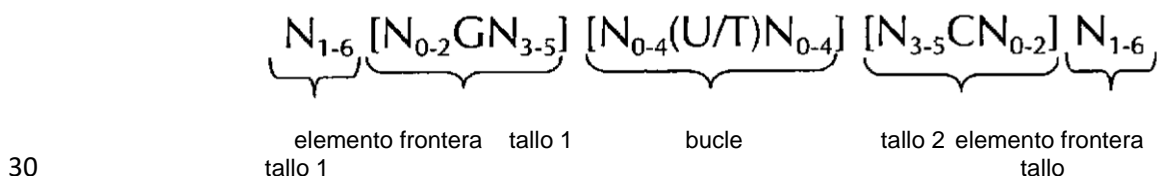
- 20 a) la región codificadora
b) una secuencia poli(A); y
c) al menos un tallo-bucle de histona;

donde el al menos un tallo-bucle de histona en i) o ii) se selecciona de las fórmulas (I) o (II)

fórmula (I) (secuencia tallo-bucle sin elementos frontera de tallo):



fórmula (II) (secuencia de tallo-bucle con elementos frontera de tallo):



donde:

los elementos frontera N_{1-6} de tallo 1 o tallo 2 es una secuencia consecutiva de 1 a 6, de manera preferente de 2 a 6, de manera más preferente de 2 a 5, aún de manera más preferente de 3 a 5, de manera mucho más preferente de 4 a 5 o 5 N, donde cada N se selecciona independientemente de un nucleótido seleccionado de A, U, T, G y C, o un análogo de nucleótido del mismo;

35 tallo 1 $[N_{0-2}GN_{3-5}]$ es una complementariedad inversa o complementariedad parcialmente inversa con el elemento tallo 2, y es una secuencia consecutiva de entre 5 a 7 nucleótidos; donde N_{0-2} es una secuencia consecutiva de 0 a 2, de manera preferente de 0 a 1, de manera más preferente de 1 N, en donde cada N se selecciona

independientemente de un nucleótido seleccionado de A, U, T, G y C o un análogo de nucleótido del mismo; donde N_{3-5} es una secuencia consecutiva de 3 a 5, de manera preferente de 4 a 5, de manera más preferente de 4 N, en donde cada N se selecciona independientemente de otro de un nucleótido seleccionado de A, U, T, G y C o un análogo de nucleótido del mismo, y donde G es guanósina o un análogo de la misma, y se puede reemplazar opcionalmente por una citidina o un análogo de la misma, con la condición de que su citidina de nucleótido complementaria en el tallo 2 se reemplace por guanósina;

la secuencia de bucle $[N_{0-4}(U/T)N_{0-4}]$ se sitúa entre los elementos tallo 1 y tallo 2, y es una secuencia consecutiva de 3 a 5 nucleótidos, de manera más preferente de 4 nucleótidos; donde cada N_{0-4} es independientemente una secuencia consecutiva de 0 a 4, de manera preferente de 1 a 3, de manera más preferente de 1 a 2 N, en donde cada N se selecciona independientemente de otro de un nucleótido seleccionado de A, U, T, G y C o un análogo de nucleótido del mismo; y donde U/T representa uridina, u opcionalmente timidina;

tallo 2 $[N_{3-5}CN_{0-2}]$ es complementariedad inversa o complementariedad parcialmente inversa con el elemento tallo 1 y es una secuencia consecutiva entre 5 a 7 nucleótidos; donde N_{3-5} es una secuencia consecutiva de 3 a 5, de manera preferente de 4 a 5, de manera más preferente de 4 N, en donde cada N se selecciona independientemente de un nucleótido seleccionado de A, U, T, G y C o un análogo de nucleótido del mismo; donde N_{0-2} es una secuencia consecutiva de 0 a 2, de manera preferente de 0 a 1, de manera más preferente de 1 N, en donde cada N se selecciona independientemente de un nucleótido seleccionado de A, U, T, G o C o un análogo de nucleótido del mismo; y donde C es citidina o un análogo de la misma, y se puede reemplazar opcionalmente por una guanósina o un análogo de la misma con la condición de que su guanósina de nucleótido complementaria en el tallo 1 se reemplace por citidina;

donde

tallo 1 y tallo 2 son capaces de un emparejamiento de bases entre sí formando una secuencia complementaria inversa, donde el emparejamiento de bases puede presentarse entre el tallo 1 y tallo 2, o formando una secuencia complementaria parcialmente inversa, donde un emparejamiento de bases incompleto puede presentarse entre tallo 1 y tallo 2, y

donde el al menos un tallo-bucle de histona se une a un tallo-bucle de una proteína de enlace (SLBP); o

composición según la reivindicación 11

para su uso como medicamento.

13. Kit o kit de partes según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10, comprendiendo el kit o kit de partes:

A) un ácido nucleico que comprende o codifica para una región codificante, donde la región codificante codifica al menos un péptido o proteína, que comprende el antígeno tumoral NY-ESO-1 o un fragmento del mismo;

B) un ácido nucleico que comprende o codifica para una región codificante, donde la región codificante codifica al menos un péptido o proteína, que comprende el antígeno tumoral 5T4 o un fragmento del mismo;

C) un ácido nucleico que comprende o codifica para una región codificante, donde la región codificante codifica al menos un péptido o proteína, que comprende el antígeno tumoral survinina o un fragmento del mismo;

D) un ácido nucleico que comprende o codifica para una región codificante, donde la región codificante codifica al menos un péptido o proteína, que comprende el antígeno tumoral MAGE-C1 o un fragmento del mismo;

E) un ácido nucleico que comprende o codifica para una región codificante, donde la región codificante codifica al menos un péptido o proteína, que comprende el antígeno tumoral MAGE-C2 o un fragmento del mismo;

donde el fragmento de NY-ESO-1, 5T4, survinina, MAGE-C1 o MAGE-C2 tiene una longitud de al menos seis residuos aminoácidos;

donde cada secuencia de ácido nucleico A, B, C, D o E, en la dirección 5' a 3', comprende o codifica para

i)

a) la región codificante

b) al menos un tallo-bucle de histona, y

c) una secuencia poli(A);

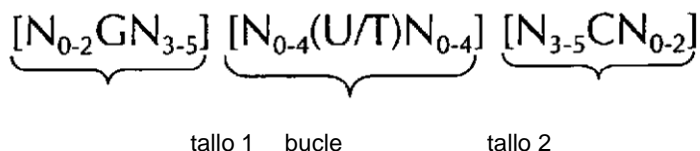
o

ii)

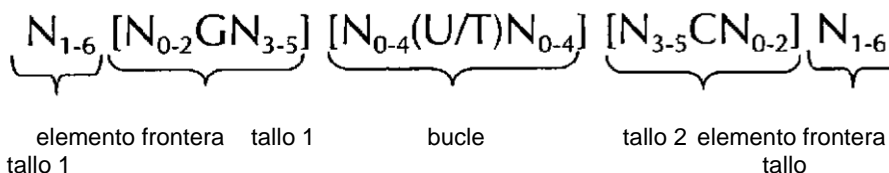
- a) la región codificadora
- b) una secuencia poli(A); y
- c) al menos un tallo-bucle de histona;

donde el al menos un tallo-bucle de histona en i) o ii) se selecciona de las fórmulas (I) o (II)

5 fórmula (I) (secuencia tallo-bucle sin elementos frontera de tallo):



fórmula (II) (secuencia de tallo-bucle con elementos frontera de tallo):



10

donde:

15 los elementos frontera N_{1-6} de tallo 1 o tallo 2 es una secuencia consecutiva de 1 a 6, de manera preferente de 2 a 6, de manera más preferente de 2 a 5, aún de manera más preferente de 3 a 5, de manera mucho más preferente de 4 a 5 o 5 N, donde cada N se selecciona independientemente de un nucleótido seleccionado de A, U, T, G y C, o un análogo de nucleótido del mismo;

20 tallo 1 $[N_{0-2}GN_{3-5}]$ es una complementariedad inversa o complementariedad parcialmente inversa con el elemento tallo 2, y es una secuencia consecutiva de entre 5 a 7 nucleótidos; donde N_{0-2} es una secuencia consecutiva de 0 a 2, de manera preferente de 0 a 1, de manera más preferente de 1 N, en donde cada N se selecciona independientemente de un nucleótido seleccionado de A, U, T, G y C o un análogo de nucleótido del mismo; donde N_{3-5} es una secuencia consecutiva de 3 a 5, de manera preferente de 4 a 5, de manera más preferente de 4 N, en donde cada N se selecciona independientemente de otro de un nucleótido seleccionado de A, U, T, G y C o un análogo de nucleótido del mismo, y donde G es guanosina o un análogo de la misma, y se puede reemplazar opcionalmente por una citidina o un análogo de la misma, con la condición de que su citidina de nucleótido complementaria en el tallo 2 se reemplace por guanosina;

25 la secuencia de bucle $[N_{0-4}(U/T)N_{0-4}]$ se sitúa entre los elementos tallo 1 y tallo 2, y es una secuencia consecutiva de 3 a 5 nucleótidos, de manera más preferente de 4 nucleótidos; donde cada N_{0-4} es independientemente una secuencia consecutiva de 0 a 4, de manera preferente de 1 a 3, de manera más preferente de 1 a 2 N, en donde cada N se selecciona independientemente de otro de un nucleótido seleccionado de A, U, T, G y C o un análogo de nucleótido del mismo; y donde U/T representa uridina, u opcionalmente timidina;

30 tallo 2 $[N_{3-5}CN_{0-2}]$ es complementariedad inversa o complementariedad parcialmente inversa con el elemento tallo 1 y es una secuencia consecutiva entre 5 a 7 nucleótidos; donde N_{3-5} es una secuencia consecutiva de 3 a 5, de manera preferente de 4 a 5, de manera más preferente de 4 N, en donde cada N se selecciona independientemente de un nucleótido seleccionado de A, U, T, G y C o un análogo de nucleótido del mismo; donde N_{0-2} es una secuencia consecutiva de 0 a 2, de manera preferente de 0 a 1, de manera más preferente de 1 N, en donde cada N se selecciona independientemente de un nucleótido seleccionado de A, U, T, G o C o un análogo de nucleótido del mismo; y donde C es citidina o un análogo de la misma, y se puede reemplazar opcionalmente por una guanosina o un análogo de la misma con la condición de que su guanosina de nucleótido complementaria en el tallo 1 se reemplace por citidina;

35 donde

tallo 1 y tallo 2 son capaces de un emparejamiento de bases entre sí formando una secuencia complementaria inversa, donde el emparejamiento de bases puede presentarse entre el tallo 1 y tallo 2, o formando una secuencia complementaria parcialmente inversa, donde un emparejamiento de bases incompleto puede presentarse entre tallo 1 y tallo 2, y

40 donde el al menos un tallo-bucle de histona se une a un tallo-bucle de una proteína de enlace (SLBP); o

45

composición según la reivindicación 11

para su uso en el tratamiento de enfermedades cancerosas o tumorales.

14. Kit o kit de partes o composición para su uso según la reivindicación 13, donde la enfermedad cancerosa o tumoral es cáncer de pulmón de células no pequeñas.
- 5 15. Composición farmacéutica que comprende los ácidos nucleicos como se definen según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10 en relación al kit o kit de partes o composición como se define en la reivindicación 11 y opcionalmente un portador farmacéuticamente aceptable.
16. Uso del kit o kit de partes según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10 o composición según la reivindicación 11 para incrementar la expresión de dicho péptido o proteína codificada *in vitro*.
- 10 17. Método *in vitro* para incrementar la expresión de un péptido o proteína codificada que comprende las etapas de:
- a) proporcionar el kit o kit de partes según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10 o la composición según la reivindicación 11,
 - b) aplicar o administrar los ácidos nucleicos del kit o kit de partes o de la composición a un sistema de expresión libre de células, a una célula o a un tejido.
- 15 18. Ácido nucleico seleccionado del grupo consistente en las SEQ ID NO 57 y SEQ ID NO 58.
19. Composición farmacéutica que comprende un ácido nucleico según la reivindicación 18.
20. Ácido nucleico según la reivindicación 18 o composición farmacéutica según la reivindicación 19 para su uso en el tratamiento de enfermedades cancerosas o tumorales.
- 20 21. Ácido nucleico o composición farmacéutica según la reivindicación 20, donde la enfermedad cancerosa o tumoral es cáncer de pulmón de células no pequeñas.

					<	<	<	<	<	<																
#A	2224	1586	3075	2872	1284	184	0	13	12	9	1	47	59	0	675	3818	195	1596	523	0	14	3727	61	771	2012	2499
#T	172	188	47	205	19	8	0	569	1620	199	3967	3830	3784	4001	182	1	21	15	11	0	179	8	64	557	201	890
#C	1557	2211	875	918	2625	270	0	3394	2342	3783	51	119	222	0	3140	2	50	11	16	4901	3543	154	3870	2676	1744	674
#G	25	16	4	6	23	3541	4001	25	27	10	2	5	11	0	4	175	3735	2359	3451	0	265	112	4	37	43	138
Cond	N°	N°	N	N	N	N	G	N	N	N	N	N	N	T	N	N	N	N	N	C	N	N	N	N°	N°	N°
95%	H°	H°	H	H	V	V	G	Y	Y	Y	Y	H	H	I	H	R	V	V	R	C	B	V	II	H°	N°	N°
95%	M°	H°	M	H	M	S	G	Y	Y	Y	T	T	Y	T	M	A	R	R	R	C	S	M	C	H°	H°	H°
90%	M°	M°	M	M	M	S	G	V	Y	C	T	T	T	T	M	A	G	R	R	C	S	A	C	H°	M°	H°

Tallo 1

Bucle

Tallo 2

Figura 1

#A	52	32	71	82	76	13	0	12	12	9	1	46	3	0	75	82	53	79	20	0	4	94	17	35	74	56
#T	20	32	37	21	8	3	0	21	85	58	86	70	65	131	26	1	17	13	10	0	15	7	31	32	20	28
#C	45	59	20	25	38	0	0	86	8	54	42	13	58	0	27	2	6	31	10	131	112	5	82	58	30	40
#G	14	8	3	3	9	115	131	12	26	10	2	2	5	8	1	46	55	8	91	0	0	23	1	6	7	7
Com	N°	N°	N	N	N	D	G	N	N	N	N	N	T	N	N	N	N	N	N	C	H	N	N	N°	N°	N°
99%	N°	N°	N	N	N	D	G	N	N	N	B	N	N	T	H	V	N	N	N	C	H	N	H	N°	N°	N°
95%	N°	N°	H	H	N	R	G	N	N	N	Y	H	B	T	H	R	D	N	N	C	Y	D	H	H°	N°	N°
90%	N°	H°	H	H	V	R	G	N	D	B	Y	H	Y	T	H	R	D	H	N	C	Y	R	H	H°	H°	H°

Tallo 1

Bucle

Tallo 2

Figura 2

ppLuc(GC) – ag

gggagaaagcuugaggAUGGAGGACGCCAAGAACAUCAAGAAGGGCCCGGGCCCCUUCUA
 CCCGUCUGGAGGACGGGACCGCCGGCGAGCAGCUCCACAAGGCCAUGAAGCGGUACGCCCU
 GGUGCCGGGCACGAUCGCCUUCACCGACGCCACAUCGAGGUCGACAUCACCUACGCGGA
 GUACUUCGAGAUGAGCGUGCGCCUGGCCGAGGCCAUGAAGCGGUACGGCCUGAACACCAA
 CCACCGGAUCGUGGUGUGCUCGGAGAACAGCCUGCAGUUCUUCUUCGCGGUGCUGGGCGC
 CCUCUUCUUCGCGUGGCCGUCGCCCCGGCGAACGACAUCUACAACGAGCGGGAGCUGCU
 GAACAGCAUGGGGAUCAGCCAGCCGACCGUGGUGUUCGUGAGCAAGAAGGGCCUGCAGAA
 GAUCCUGAACGUGCAGAAGAAGCUGCCCAUCAUCCAGAAGAUCAUCAUCAUGGACAGCAA
 GACCGACUACCAGGGCUUCCAGUCGAUGUACACGUUCGUGACCAGCCACCUCGCGCGGG
 CUUCAACGAGUACGACUUCGUCCCGGAGAGCUUCGACCGGGACAAGACCAUCGCCUGAU
 CAUGAACAGCAGCGGCAGCACCGGCCUGCCGAAGGGGGUGGCCUUGCCGCACCGGACCGC
 CUGCGUGCGCUUCUCGCACGCCCGGGACCCAUUCUUCGGCAACCAGAUCAUCCCGGACAC
 CGCCAUCCUGAGCGUGGUGCCGUUCCACCACGGCUUCGGCAUGUUCACGACCCUGGGCUA
 CCUCAUCUGCGGCUUCCGGGUGGUCCUGAUGUACCGGUUCGAGGAGGAGCUGUUCUGCG
 GAGCCUGCAGGACUACAAGAUCAGAGCGCGCUGCUCGUGCCGACCCUGUUCAGCUUCUU
 CGCCAAGAGCACCCUGAUCGACAAGUACGACCUGUCGAACCUGCACGAGAUCCAGCGG
 GGGCGCCCCGUCGAGCAAGGAGGUGGGCGAGGCCGUGGCCAAGCGGUUCCACCUCGCGG
 CAUCCGCCAGGGCUACGGCCUGACCGAGACCACGAGCGCGAUCCUGAUCACCCCCGAGGG
 GGACGACAAGCCGGGCGCCGUGGGCAAGGUGGUCCCCUUCUUCGAGGCCAAGGUGGUGGA
 CCUGGACACCGGCAAGACCCUGGGCGUGAACAGCGGGGCGAGCUGUGCGUGCGGGGGCC
 GAUGAUCAUGAGCGGCUACGUGAACAACCCGGAGGCCACCAACGCCCUCAUCGACAAGGA
 CGGCUGGCUGCACAGCGGGGACAUCGCCUACUGGGACGAGGACGAGCACUUCUUAUCGU
 CGACCGGCUGAAGUCGUGAUCAGUACAAGGGCUACCAGGUGGCGCCGGCCGAGCUGGA
 GAGCAUCCUGUCUCCAGCACCCCAACAUCUUCGACGCCGGCGUGGCCGGGCGGCCGACGA
 CGACCGCCGGCGAGCUGCCGGCCGCGGUGGUGGUGCUGGAGCACGGCAAGACCAUGACGGA
 GAAGGAGAUUCGUCGACUACGUGGCCAGCCAGGUGACCACCGCCAAGAAGCUCGCGGGCGG
 CGUGGUGUUCGUGGACGAGGUCCCGAAGGGCCUGACCGGGAAGCUCGACGCCCGGAAGAU
 CCGCGAGAUCUGAUCAGGCCAAGAAGGGCGGCAAGAUCGCCGUGUA
 agacuaguuua
 agacugacua**GCCCGAUGGGCCUCCCAACGGGCCCUCUCCCCUCUUGCACCG**agauua
 auagauc-3'

Figura 6

ppLuc(GC) – ag – A64

gggagaaagcuugaggAUGGAGGACGCCAAGAACAUCAAGAAGGGCCCCGGCGCCCUUCUA
 CCCGCUGGAGGACGGGACCGCCGGCGAGCAGCUCCACAAGGCCAUGAAGCGGUACGCCCU
 GGUGCCCGGGCACGAUCGCCUUCACCGACGCCACAUCGAGGUCGACAUCACCUACGCGGA
 GUACUUCGAGAUGAGCGUGCGCCUGGCCGAGGCCAUGAAGCGGUACGGCCUGAACACCAA
 CCACCGGAUCGUGGUGUGUCUCGGAGAACAGCCUGCAGUUCUUCUUGCCGGUGCUGGGCGC
 CCUCUUCUUCGCGUGGGCCGUCGCCCCCGGCGAACGACAUCUACAACGAGCGGGAGCUGCU
 GAACAGCAUGGGGAUCAGCCAGCCGACCGUGGUGUUCGUGAGCAAGAAGGGCCUGCAGAA
 GAUCCUGAACGUGCAGAAGAAGCUGCCCAUCAUCCAGAAGAUCAUCAUCAUGGACAGCAA
 GACCGACUACCAGGGCUUCCAGUCGAUGUACACGUUCGUGACCAGCCACCUCCCGCCGGG
 CUUCAACGAGUACGACUUCGUUCCCGGAGAGCUUCGACCGGGACAAGACCAUCGCCUUGAU
 CAUGAACAGCAGCGGCAGCACCGGCCUGCCGAAGGGGGUGGCCUUGCCGCACCGGACCGC
 CUGCGUGCGCUUCUCGCACGCCCGGGACCCCAUCUUCGGCAACCAGAUCAUCCCGGACAC
 CGCCAUCCUGAGCGUGGUGCCGUUCCACCACGGCUUCGGCAUGUUCACGACCCUGGGCUA
 CCUCAUCUGCGGCUUCCGGGUGGUCCUGAUGUACCGGUUCGAGGAGGAGCUGUUCUGCG
 GAGCCUGCAGGACUACAAGAUCAGAGCGCGCUGCUCGUGCCGACCCUGUUCAGCUUCUU
 CGCCAAGAGCACCCUGAUCGACAAGUACGACCUGUCGAACCUGCACGAGAUCCGCCAGCGG
 GGGCGCCCCGUGAGCAAGGAGGUGGGCGAGGCCGUGGCCAAGCGGUUCCACCUCCCGGG
 CAUCCGCCAGGGCUACGGCCUGACCGAGACCACGAGCGCGAUCCUGAUCACCCCCGAGGG
 GGACGACAAGCCGGGCGCCGUGGGCAAGGUGGUUCCGUUCUUCGAGGCCAAGGUGGUGGA
 CCUGGACACCGGCAAGACCCUGGGCGUGAACCAGCGGGGGCAGCUGUGCGUGCGGGGGCC
 GAUGAUCUAGAGCGGCUACGUGAACAAACCCGGAGGCCACCAACGCCCUCAUCGACAAGGA
 CGGCUGGCUGCACAGCGGCGACAUCGCCUACUGGGACGAGGACGAGCACUUCUUAUCGU
 CGACCGGCUGAAGUCGUGAUCUAGUACAAGGGCUACCAGGUGGGCGCCGGCCGAGCUGGA
 GAGCAUCCUGCUCCAGCACCCCAACAUCUUCGACCGCCGGCGUGGCCGGGCUGCCGGACGA
 CGACCGCCGGCAGCUGCCGGCCGCGGUGGUGGUGCUGGAGCACGGCAAGACCAUGACGGA
 GAAGGAGAUUCGUCGACUACGUGGCCAGCCAGGUGACCACCGCCAAGAAGCUGCGGGGGCG
 CGUGGUGUUCGUGGACGAGGUUCCGAAGGGCCUGACCGGGAAGCUCGACGCCCGGAAGAU
 CCGCGAGAUCCUGAUCUAGGCCAAGAAGGGCGGCAAGAUCCCGUGUAAgacuaguaua
 agacugacua**GCCCCAUGGGCCUCCCAACGGGCCUCCUCCCCUCCUUGCACCG**agauua
 auAA
 AAAAAA-3'

Figura 7

ppLuc (CG)-ag-histonaSL

gggagaaagcuugaggAUGGAGGACGCCAAGAACAUCAAGAAGGGCCCGGGCCCUUCUA
 CCCGUCGGAGGACGGGACCGCCGGCGAGCAGCUCCACAAGGCCAUGAAGCGGUACGCCCCU
 GGUGCCGGGCACGAUCGCCUUCACCGACGCCACAUCGAGGUCGACAUCACCUACGCGGA
 GUACUUCGAGAUGAGCGUGCGCCUGGCCGAGGCCAUGAAGCGGUACGGCCUGAACACCAA
 CCACCGGAUCGUGGUGUGUCGCGGAGAACAGCCUGCAGUUCUUCAUGCCGGUGUCGGGCGC
 CCUCUUCAUCGGCGUGGCCGUCGCCCCGGCGAACGACAUCUACAACGAGCGGGAGCUGCU
 GAACAGCAUGGGGAUCAGCCAGCCGACCGUGGUGUUCGUGAGCAAGAAGGGCCUGCAGAA
 GAUCCUGAACGUGCAGAAGAAGCUGCCCAUCAUCCAGAAGAUCAUCAUCAUGGACAGCAA
 GACCGACUACCAGGGCUUCCAGUCGAUGUACACGUUCGUGACCAGCCACCUCGCCCGGG
 CUUCAACGAGUACGACUUCGUCGCCGGAGAGCUUCGACCGGGACAAGACCAUCGCCUCGAU
 CAUGAACAGCAGCGGCAGCACCGGCCUGCCGAAGGGGGUGGCCUCGCCGCACCGGACCGC
 CUGCGUGCGCUUCUCGCACGCCCGGGACCCCAUCUUCGGCAACCAGAUCAUCCCGGACAC
 CGCCAUCCUGAGCGUGGUGCCGUUCCACCACGGCUUCGGCAUGUUCACGACCCUGGGCUA
 CCUCAUCUGCGGCUUCCGGGUGGUCCUGAUGUACCGGUUCGAGGAGGAGCUGUUCUGCG
 GAGCCUGCAGGACUACAAGAUCCAGAGCGCGCUGCUCGUGCCGACCCUGUUCAGCUUCUU
 CGCCAAGAGCACCCUGAUCGACAAGUACGACCUUGUCGAACCUGCACGAGAUCGCCAGCGG
 GGGCGCCCCGUCGAGCAAGGAGGUGGGCGAGGCCGUGGCCAAGCGGUUCCACCUCGCCGG
 CAUCCGCCAGGGCUACGGCCUGACCGAGACCACGAGCGCGAUCCUGAUCACCCCCGAGGG
 GGACGACAAGCCGGGCGCCGUGGGCAAGGUGGUCCCGUUCUUCGAGGCCAAGGUGGUGGA
 CCUGGACACCGGCAAGACCCUGGGCGUGAACCAGCGGGCGAGCUGUGCGUGCGGGGGCC
 GAUGAUC AUGAGCCGCUACGUGAACAACCCGGAGGCCACCAACGCCCUCAUCGACAAGGA
 CGGCUGGCUGCACAGCGGCGACAUCGCCUACUGGGACGAGGACGAGCACUUCUUCAUCGU
 CGACCGGCUGAAGUCGCUGAUCAAGUACAAGGGCUACCAGGUGGCGCCGGCCGAGCUGGA
 GAGCAUCCUGCUCAGCACCCCAACAUCUUCGACGCCGGCGUGGCCGGGCGUGCCGGACGA
 CGACGCCGGCGAGCUGCCGGCCCGGUGGUGGUGCUGGAGCACGGCAAGACCAUGACGGA
 GAAGGAGAUCGUCGACUACGUGGCCAGCCAGGUGACCACCGCCAAGAAGCUGCGGGGCGG
 CGUGGUGUUCGUGGACGAGGUCCC GAAGGGCCUGACCGGGAAGCUCGACGCCCGGAAGAU
 CCGCGAGAUCCUGAUC AAGGCCAAGAAGGGCGGCAAGAUJCGCCGUGUAAgacuaguaua
 agacugacua**GCCCGAUGGGCCUCCCAACGGGCCCCUCCUCCCCUCCUUGCACCG**agauua
 auagaucuCAAAGGCUCUUUUUCAGAGCCACCA-3'

Figura 8

ppLuc (CG)-ag-A64-histonaSL

gggagaaagcuugaggAUGGAGGACGCCAAGAACAUCAAGAAGGGCCCGGCGCCCUUCUA
 CCCGCUUGGAGGACGGGACCGCCGGCGAGCAGCUCCACAAGGCCAUGAAGCGGUACGCCCU
 GGUGCCGGGCACGAUCGCCUUCACCGACGCCACAUCGAGGUCGACAUCACCUACGCGGA
 GUACUUCGAGAUGAGCGUGCGCCUGGCCGAGGCCAUGAAGCGGUACGGCCUGAACACCAA
 CCACCGGAUCGUGGUGUCUCGGAGAACAGCCUCGAGUUCUUCUUCGCGGUGCUGGGCGC
 CCUCUUCUUCGCGUGGCCGUCGCCCGGGCGAACGACAUCUACAACGAGCGGGAGCUGCU
 GAACAGCAUGGGGAUCAGCCAGCCGACCGUGGUGUUCGUGAGCAAGAAGGGCCUUCAGAA
 GAUCCUGAACGUGCAGAAGAAGCUGCCAUCAUCCAGAAGAUCAUCAUCAUGGACAGCAA
 GACCGACUACCAGGGCUUCCAGUCGAUGUACACGUUCGUGACCAGCCACCUCCCGCCGGG
 CUUCAACGAGUACGACUUCGUCGCCGGAGAGCUUCGACCGGGACAAGACCAUCGCCUCGAU
 CAUGAACAGCAGCGGCAGCACCCGGCCUGCCGAAGGGGGUGGCCUUGCCGCACCGGACCGC
 CUGCGUGCGCUUCUCGCACGCCCGGGACCCCAUCUUCGGCAACCAGAUCAUCCGGACAC
 CGCCAUCCUGAGCGUGGUGCCGUUCCACCACGGCUUCGGCAUGUUCACGACCCUGGGCUA
 CCUCAUCUGCGGCUUCCGGGUGGUCCUGAUGUACCGGUUCGAGGAGGAGCUGUUCUGCG
 GAGCCUGCAGGACUACAAGAUCAGAGCGCGCUGCUCGUGCCGACCCUGUUCAGCUUCU
 CGCCAAGAGCACCCUGAUCGACAAGUACGACCUGUCGAACCUGCAGGAGAUCCAGCGG
 GGGCGCCCCGUGAGCAAGGAGGUGGGCGAGGCCGUGCCAAGCGGUUCCACCUCCCGGG
 CAUCCGCCAGGGCUACGGCCUGACCGAGACCACGAGCCGAUCCUGAUCACCCCGAGGG
 GGACGACAAGCCGGGCGCCGUGGGCAAGGUGGUCCCGUUCUUCGAGGCCAAGGUGGUGGA
 CCUGGACACCGGCAAGACCCUGGGCGUGAACAGCGGGGCGAGCUGUGCGUGCGGGGGCC
 GAUGAUCAUGAGCGGUACGUGAACAAACCCGGAGGCCACCAACGCCUUCUUCGACAAGGA
 CGGCUGGCUGCACAGCGGCGACAUCGCCUACUGGGACGAGGACGAGCACUUCUUCUUCGU
 CGACCGGCUGAAGUCGUGAUCAGUACAAGGGCUACCAGGUGGCGCCGGCCGAGCUGGA
 GAGCAUCCUGCUCCAGCACCCCAACAUCUUCGACGCCGGCGUGGCCGGGCGGCCGACGA
 CGACCGCGGCGAGCUGCCGGCCGCGGUGGUGGUGCUGGAGCACGGCAAGACCAUGACGGA
 GAAGGAGAUUCGUGACUACGUGGCCAGCCAGGUGACCACCGCCAAGAAGCUGCGGGGCGG
 CGUGGUGUUCGUGGACGAGGUCCCAGGGGCCUGACCGGGAAGCUCGACGCCCGGAAGAU
 CCGCGAGAUCCUGAUCAGGCCAAGAAGGGCGGCAAGAUCGCCGUGUA Agacuaguua
agacugacua**GCCC**GAUGGGCCUCCCAACGGGCCCCUCCUCCCCUCCUUGCACCGagauua
auAA
 AAAAAugcauCAAAGGCUCUUUCAGAGCCACCA-3'

Figura 9

ppLuc(GC) – ag – A120

gggagaaagcuugaggAUGGAGGACGCCAAGAACAUCAAGAAGGGCCCGGCGCCCUUCUA
CCCGCUGGAGGACGGGACCGCCGGCGAGCAGCUCCACAAGGCCAUGAAGCGGUACGCCCU
GGUGCCGGGCACGAUCGCCUUCACCGACGCCACAUCGAGGUCGACAUCACCUACGCGGA
GUACUUCGAGAUGAGCGUGCGCCUGGCCGAGGCCAUGAAGCGGUACGGCCUGAACACCAA
CCACCGGAUCGUGGUGUGCUCGAGAACAGCCUGCAGUUCUUCUUCUUGCCGGUGUGGGCGC
CCUCUUCUUCGCGGUGGCCGUCGCCCGGCGAACGACAUCUACAACGAGCGGGAGCUGCU
GAACAGCAUGGGGAUCAGCCAGCCGACCGUGGUGUUCGUGAGCAAGAAGGGCCUGCAGAA
GAUCCUGAACGUGCAGAAGAAGCUGCCC AUCAUCCAGAAGAUCAUCAUCAUGGACAGCAA
GACCGACUACCAGGGCUUCCAGUCGAUGUACACGUUCGUGACCAGCCACCUCGCCCGGG
CUUCAACGAGUACGACUUCGUCCCCGGAGAGCUUCGACCGGGACAAGACCAUCGCCCUGAU
CAUGAACAGCAGCGGCAGCACCGGCCUGCCGAAGGGGGUGGCCUGCCGCACCGGACCGC
CUGCGUGCGCUUCUCGCACGCCCGGGACCCAUUCUUCGGCAACCAGAUCAUCCCGGACAC
CGCCAUCCUGAGCGUGGUGCCGUUCCACCAGGCCUUCGGCAUGUUCACGACCCUGGGCUA
CCUCAUCUGCGGCUUCCGGGUGGUCUGAUGUACCGGUUCGAGGAGGAGCUGUUCUGCG
GAGCCUGCAGGACUACAAGAUCAGAGCGCGCUGCUCGUGCCGACCCUGUUCAGCUUCU
CGCCAAGAGCACCCUGAUCGACAAGUACGACCUGUCGAACCUGCAGAGAUCCGACGCG
GGGCGCCCCGUGAGCAAGGAGGUGGGCGAGGCCGUGGCCAAGCGGUUCCACCUCGCCGG
CAUCCGCCAGGGCUACGGCCUGACCGAGACCACGAGCGCGAUCCUGAUCACCCCGAGGG
GGACGACAAGCCGGGCGCCGUGGGCAAGGUGGUCCCGUUCUUCGAGGCCAAGGUGGUGGA
CCUGGACACCGGCAAGACCCUGGGCGUGAACCCAGCGGGGCGAGCUGUGCGUGCGGGGGCC
GAUGAUC AUGAGCGGCUACGUGAACAAACCCGGAGGCCACCAACGCCCUCAUCGACAAGGA
CGGCUGGCUGCACAGCGGCGACAUCGCCUACUGGGACGAGGACGAGCACUUCUUCUUCU
CGACCGGCGUGAAGUCGUGAUC AAGUACAAGGGCUACCAGGUGGCGCCGGCCGAGCUGGA
GAGCAUCCUGCUCCAGCACCCCAACAUUCUUCGACGCCGGCGUGGCCGGGUGCCGGACGA
CGACCGCGGCGAGCUGCCGGCCGCGGUGGUGGUGCUGGAGCACGGCAAGACCAUGACGGA
GAAGGAGAUCGUCGACUACGUGGCCAGCCAGGUGACCACCGCCAAGAAGCUGCGGGGCGG
CGUGGUGUUCGUGGACGAGGUCCCGAAGGGCCUGACCGGGAAGCUCGACGCCCGGAAGAU
CCGCGAGAUCUGAUC AAGGCCAAGAAGGGCGGCAAGAUCGCCGUGUAagacuaguaua
agacugacua**GCCCGAUGGGCCUCCCAACGGGCCCUCUCCCCUCCUUGCACCG**agauua
auagaucuAA
AA
AAAAAAAAA-3'

Figura 10

ppLuc(GC) – ag – A64 – ag

gggagaaagcuugaggAUGGAGGACGCCAAGAACAUCAAGAAGGGCCCGGCGCCUUCUA
 CCCGCUUGGAGGACGGGACCGCCGGCGAGCAGCUCCACAAGGCCAUGAAGCGGUACGCCU
 GGUGCCGGGCACGAUCGCCUUCACCGACGCCCACAUUCGAGGUCGACAUCACCUACGCGGA
 GUACUUCGAGAUGAGCGUGCGCCUGGCCGAGGCCAUGAAGCGGUACGGCCUGAACACCAA
 CCACCGGAUCGUGGUGUGCUCGGAGAACAGCCUGCAGUUCUUCUUGCCGGUGCUGGGCGC
 CCUCUUCUUCGCGUGGGCCGUCGCCCGGCGAACGACAUCUACAACGAGCGGGAGCUGCU
 GAACAGCAUGGGGAUCAGCCAGCCGACCGUGGUGUUCGUGAGCAAGAAGGGCCUGCAGAA
 GAUCCUGAACGUGCAGAAGAAGCUGCCCAUCAUCCAGAAGAUAUCAUCAUGGACAGCAA
 GACCGACUACCAGGGCUUCCAGUCGAUGUACACGUUCGUGACCAGCCACCUCGCCCGGG
 CUUCAACGAGUACGACUUCGUCCCCGGAGAGCUUCGACCGGGACAAGACCAUCGCCUUGAU
 CAUGAACAGCAGCGGCAGCACCGGCCUGCCGAAGGGGGUGGCCUGCCGCACCGGACCGC
 CUGCGUGCGCUUCUCGCACGCCCGGGACCCCAUCUUCGGCAACCAGAUCAUCCCGGACAC
 CGCCAUCCUGAGCGUGGUGCCGUUCCACCACGGCUUCGGCAUGUUCACGACCCUGGGCUA
 CCUCAUCUGCGGCUUCCGGGUGGUCCUGAUGUACCGGUUCGAGGAGGAGCUGUUCUGCG
 GAGCCUGCAGGACUACAAGAUAUCAGAGCGCGCUCUCUGGCCGACCCUGUUCAGCUUCU
 CGCCAAGAGCACCCUGAUCGACAAGUACGACCUGUCGAACCUGCAGAGAUCCGACCGG
 GGGCGCCCCGCUAGCAAGGAGGUGGGCGAGGCCGUGGCCAAGCGGUUCCACCUCCGGG
 CAUCCGCCAGGGCUACGGCCUGACCGAGACCACGAGCGCGAUCCUGAUCACCCCCGAGGG
 GGACGACAAGCCGGGCGCCGUGGGCAAGGUGGUCCCGUUCUUCGAGGCCAAGGUGGUGGA
 CCUGGACACCGGCAAGACCCUGGGCGUGAACACGCGGGGCGAGCUGUGCGUGCGGGGGCC
 GAUGAUCAUGAGCGGCUACGUGAACAAACCCGGAGGCCACCAACGCCUUCUUCGACAAGGA
 CGGCUUGGUCGACAGCGGCGACAUCGCCUACUGGGACGAGGACGAGCACUUCUUCUUCG
 CGACCGGCUGAAGUCGUGAUCUAGUACAAGGGCUACCAGGUGGGCGCCGGCCGAGCUGGA
 GAGCAUCCUGCUCCAGCACCCCAACAUCUUCGACGCCGGCGUGGCCGGGCUCCGGACGA
 CGACGCCGGCGAGCUGCCGGCCCGGGUGGUGGUGCUGGAGCACGGCAAGACCAUGACGGA
 GAAGGAGAUUCGUCGACUACGUGGCCAGCCAGGUGACCACCGCCAAGAAGCUGCGGGGCGG
 CGUGGUGUUCGUGGACGAGGUCCCGAAGGGCCUGACCGGGAAGCUCGACGCCCGGAAGAU
 CCGCGAGAUCUGAUCUAAAGGCCAAGAAGGGCGGCAAGAUCGCCGUGUAAGacuaguua
 agacugacua**GCCCGAUGGGCCUCCAAACGGGCCCUCUCCCCUCCUUGCACCG**agauua
 auAA
 AAAAAAugcau**CCUGCCCGAUGGGCCUCCAAACGGGCCCUCUCCCCUCCUUGCACCG**3'

Figura 11

ppLuc(GC) – ag – A64 – aCPSL

gggagaaagcuugaggAUGGAGGACGCCAAGAACAUCAAGAAGGGCCCCGGCGCCCUUCUA
 CCCGCUGGAGGACGGGACCGCCGGCGAGCAGCUCCACAAGGCCAUGAAGCGGUACGCCCU
 GGUGCCGGGCACGAUCGCCUUCACCGACGCCACAUCGAGGUCGACAUCACCUACGCGGA
 GUACUUCGAGAUGAGCGUGCGCCUUGGCCGAGGCCAUGAAGCGGUACGGCCUGAACACCAA
 CCACCGGAUCGUGGUGUGCUCGGAGAACAGCCUGCAGUUCUUCAUGCCGGUGCUGGGCGC
 CCUCUUCAUCGGCGUGGCCGUCGCCCGGGCGAACGACAUCUACAACGAGCGGGAGCUGCU
 GAACAGCAUGGGGAUCAGCCAGCCGACCGUGGUGUUCGUGAGCAAGAAGGGCCUGCAGAA
 GAUCCUGAACGUGCAGAAGAAGCUGCCCAUCAUCCAGAAGAUCAUCAUCAUGGACAGCAA
 GACCGACUACCAGGGCUUCCAGUCGAUGUACACGUUCGUGACCAGCCACCUCGCCCGGG
 CUUCAACGAGUACGACUUCGUCCCCGGAGAGCUUCGACCGGGACAAGACCAUCGCCUGAU
 CAUGAACAGCAGCGGCAGCACCGGCCUGCCGAAGGGGGUGGCCUUGCCGCACCGGACCGC
 CUGCGUGCGCUUCUCGCACGCCCGGGACCCCAUCUUCGGCAACCAGAUCAUCCGACAC
 CGCCAUCCUGAGCGUGGUGCCGUUCCACCAGGCUUCGGCAUGUUCACGACCCUGGGCUA
 CCUCAUCUGCGGUUCCGGGUGGUCCUGAUGUACCGGUUCGAGGAGGAGCUGUUCUGCG
 GAGCCUGCAGGACUACAAGAUCCAGAGCGCGCUGCUCGUGCCGACCCUGUUCAGCUUCUU
 CGCCAAGAGCACCCUGAUUCGACAAGUACGACCUGUCGAACCUGCACGAGAUCCGACGCG
 GGGCGCCCCGUGAGCAAGGAGGUGGGCGAGGCCGUGGCCAAGCGGUUCCACCUCGCCGG
 CAUCCGCCAGGGCUACGGCCUGACCGAGACCACGAGCGCGAUCCUGAUCACCCCCGAGGG
 GGACGACAAGCCGGGCGCCGUGGGCAAGGUGGUCCCGUUCUUCGAGGCCAAGGUGGUGGA
 CCUGGACACCGGCAAGACCCUGGGCGUGAACCAGCGGGGCGAGCUGUGCGUGCGGGGGCC
 GAUGAUC AUGAGCGGCUACGUGAACAAACCCGGAGGCCACCAACGCCCUCAUCGACAAGGA
 CGGCUGGCUGCACAGCGGCGACAUCGCCUACUGGGACGAGGACGAGCACUUCUUCAUCGU
 CGACCGGCUGAAGUCGUGAUC AAGUACAAGGGCUACCAGGUGGCGCCGGCCGAGCUGGA
 GAGCAUCCUGCUCACGACCCCAACAUCUUCGACGCCGCGUGGGCCGGGCGGCCGACGA
 CGACGCCGGCGAGCUGCCGGCCGCGGUGGUGGUGCUGGAGCACGGCAAGACCAUGACGGA
 GAAGGAGAUCGUCGACUACGUGGCCAGCCAGGUGACCACCGCCAAGAAGCUGCGGGGCGG
 CGUGGUGUUCGUGGACGAGGUCCCGAAGGGCCUGACCGGGAAGCUCGACGCCCGGAAGAU
 CCGCGAGAUCUGAUC AAGGCCAAGAAGGGCGGCAAGAUCCCGUGUAAgacuaguaua
 agacugacua**GCCC GAUGGGCCUCCCAACGGGCCUCCUCCCCUCCUUGCACCG**agauua
 auAAA
 AAAAAAugcauCAAUCCUACACGUGAGGCGCUGUGAUUCCCUAUCCCCCUUCAUCCCCU
 AUACAUUAGCACAGCGCCAUUGCAUGUAGGAAUU-3'

Figura 12

ppLuc(GC) – ag – A64 – PolioCL

gggagaaagcuugaggAUGGAGGACGCCAAGAACAUCAAGAAGGGCCCCGGCGCCCUUCUA
 CCCGUGGAGGACGGGACCGCCGGCGAGCAGCUCCACAAGGCCAUGAAGCGGUACGCCCU
 GGUGCCGGGCACGAUCGCCUUCACCGACGCCACAUCGAGGUCGACAUCACCUACGCGGA
 GUACUUCGAGAUGAGCGUGCGCCUGGCCGAGGCCAUGAAGCGGUACGGCCUGAACACCAA
 CCACCGGAUCGUGGUGUGCUCGGAGAACAGCCUGCAGUUCUUCAUGCCGGUGCUGGGCGC
 CCUCUUCAUCGGCGUGGCCGUCGCCCGCGAACGACAUCUACAACGAGCGGGAGCUGCU
 GAACAGCAUGGGGAUCAGCCAGCCGACCGUGGUGUUCGUGAGCAAGAAGGGCCUGCAGAA
 GAUCCUGAACGUGCAGAAGAAGCUGCCAUCAUCCAGAAGAUCAUCAUUGGACAGCAA
 GACCGACUACCAGGGCUUCCAGUCGAUGUACACGUUCGUGACCAGCCACCUCGCCCGGG
 CUUCAACGAGUACGACUUCGUCCCGGAGAGCUUCGACCGGGACAAGACCAUCGCCUGAU
 CAUGAACAGCAGCGGCAGCACCGGCCUGCCGAAGGGGGUGGCCUCGCCGACCGGACCGC
 CUGCGUGCGCUUCUCGCACGCCCGGGACCCCAUCUUCGGCAACCAGAUCAUCCGGACAC
 CGCCAUCCUGAGCGUGGUGCCGUUCCACCACGGCUUCGGCAUGUUCACGACCCUGGGCUA
 CCUCAUCUGCGGCUUCCGGGUGGUCCUGAUGUACCGGUUCGAGGAGGAGCUGUUCUGCG
 GAGCCUGCAGGACUACAAGAUCAGAGCGCGCUGCUCGUGCCGACCCUGUUCAGCUUCU
 CGCCAAGAGCACCCUGAUCGACAAGUACGACCUGUCGAACCUGCACGAGAUCCAGCGG
 GGGCGCCCCGUGAGCAAGGAGGUGGGCGAGGCCGUGGCCAAGCGGUUCCACCUCGGG
 CAUCCGCCAGGGCUACGGCCUGACCGAGACCACGAGCGCGAUCCUGAUCACCCCGAGGG
 GGACGACAAGCCGGGCGCCUGGGCAAGGUGGUCCCGUUCUUCGAGGCCAAGGUGGUGGA
 CCUGGACACCGGCAAGACCUGGGCGUGAACCAGCGGGGCGAGCUGUGCGUGCGGGGGCC
 GAUGAUC AUGAGCGGCUACGUGAACAACCCGGAGGCCACCAACGCCCUCAUCGACAAGGA
 CGGCUGGCUGCACAGCGGCGACAUCGCCUACUGGGACGAGGACGAGCACUUCUUCAUCGU
 CGACCGGCUGAAGUCGUGAUCAGUACAAGGGCUACCAGGUGGCGCCGGCCGAGCUGGA
 GAGCAUCCUGCUCCAGCACCCCAACAUCUUCGACGCGGCGUGGCCGGGCUGCCGGACGA
 CGACGCCGGCGAGCUGCCGGCCGCGGUGGUGGUGCUGGAGCACGGCAAGACCAUGACGGA
 GAAGGAGAUUCGUGACUACGUGGCCAGCCAGGUGACCACCGCCAAGAAGCUGCGGGGCGG
 CGUGGUGUUCGUGGACGAGGUCCCGAAGGGCCUGACCGGGAAGCUCGACGCCCGGAAGAU
 CCGCGAGAUCCUGAUCAAGGCCAAGAAGGGCGGCAAGAUCGCCGUGUA *agacuaguuaua*
agacugacua **GCCCCAUGGGCCUCCCAACGGGCCUCCUCCCCUCCUUGCACCG** *agauua*
*au*AA
 AAAAAA *ugcau* CAAUUCUAAAACAGCUCUGGGGUUGUACCCACCCAGAGGCCACGUGG
 CGGCUAGUACUCCGGUAUUGCGGUACCCUUGUACGCCUGUUUAGAAUU-3'

Figura 13

ppLuc(GC) – ag – A64 – U30

gggagaaagcuugaggAUGGAGGACGCCAAGAACAUCAAGAAGGGCCCGCGCCCUUCUA
 CCCGUCUGGAGGACGGGACCGCCGGCGAGCAGCUCCACAAGGCCAUGAAGCGGUACGCCCU
 GGUGCCCGGCACGAUCGCCUUCACCCGACGCCACAUCGAGGUCGACAUCACCUACGCGGA
 GUACUUCGAGAUAGAGCGUGCGCCUGGCCGAGGCCAUGAAGCGGUACGGCCUGAACACCAA
 CCACCGGAUCCUGGUGUGUCUGCGGAGAACAGCCUGCAGUUCUUCUUGCCGGUGCUGGGCGC
 CCUCUUCUUCGCGUGGCCGUCGCCCGCGGAACGACAUCUACAACGAGCGGGAGCUGCU
 GAACAGCAUGGGGAUCAGCCAGCCGACCGUGGUGUUCGUGAGCAAGAAGGGCCUGCAGAA
 GAUCCUGAACGUGCAGAAGAAGCUGCCCAUCAUCCAGAAGAUCAUCAUCAUGGACAGCAA
 GACCGACUACCAGGGCUUCCAGUCGAUGUACACGUUCGUGACCAGCCACCUCGCCCGGG
 CUUCAACGAGUACGACUUCGUCGCCGGAGAGCUUCGACCGGGACAAGACCAUCGCCUCGAU
 CAUGAACAGCAGCGGCAGCACCGGCCUGCCGAAGGGGGUGGCCUCGCCGACCGGACCGC
 CUGCGUGCGCUUCUCGCACGCCCGGGACCCCAUCUUCGGCAACCAGAUCAUCCCGGACAC
 CGCCAUCCUGAGCGUGGUGCCGUUCCACCACGGCUUCGGCAUGUUCACGACCCUGGGCUA
 CCUCAUCUGCGGCUUCCGGGUGGUCCUGAUGUACCGGUUCGAGGAGGAGCUGUUCUGCG
 GAGCCUGCAGGACUACAAGAUCAGAGCGCGCUGCUCGUGCCGACCCUGUUCAGCUUCU
 CGCCAAGAGCACCCUGAUCGACAAGUACGACCUGUCGAACCUGCACGAGAUCCGACGCGG
 GGGCGCCCCGUCGAGCAAGGAGGUGGGCGAGGCCGUGGCCAAGCGGUUCCACCUCGCCGG
 CAUCCGCCAGGGCUACGGCCUGACCGAGACCACGAGCGCGAUCCUGAUCACCCCGAGGG
 GGACGACAAGCCGGGCGCCGUGGGCAAGGUGGUCCCGUUCUUCGAGGCCAAGGUGGUGGA
 CCUGGACACCGGCAAGACCCUGGGCGUGAACCAGCGGGGCGAGCUGUGCGUGCGGGGGCC
 GAUGAUC AUGAGCGGCUACGUGAACAACCCGGAGGCCACCAACGCCCUCAUCGACAAGGA
 CGGCUGGCUGCACAGCGGCGACAUCGCCUACUGGGACGAGGACGAGCACUUCUUCUUCG
 CGACCGGCUAAGUCGUGAUC AAGUACAAGGGCUACCAGGUGGCGCCGGCCGAGCUGGA
 GAGCAUCCUGCUCCAGCACCCCAACAUCUUCGACGCCCGCGUGGCCGGGCUCCCGGACGA
 CGACGCCGGCGAGCUGCCGGCCCGGGUGGUGGUGCUGGAGCACGGCAAGACCAUGACGGA
 GAAGGAGAUUCGUGACUACGUGGCCAGCCAGGUGACCACCGCCAAGAAGCUGCGGGGCGG
 CGUGGUGUUCGUGGACGAGGUCCCGAAGGGCCUGACCGGGAAGCUCGACGCCCGGAAGAU
 CCGCGAGAUCCUGAUC AAGGCCAAGAAGGGCGGCAAGAUCGCCGUGUA *agacuauua*
agacugacua **GCCCGAUGGGCCUCCCAACGGGCCUCCUCCCUCCUUGCACCG** *agauua*
*au*AA
 AAAAAA *ugca* UU-3'

Figura 15

ppLuc(GC) – ag – A64 – SL

gggagaaagcuugaggAUGGAGGACGCCAAGAACAUCAAGAAGGGCCCCGGCGCCCUUCUA
 CCCGCUUGGAGGACGGGACCGCCGGCGAGCAGCUCCACAAGGCCAUGAAGCGGUACGCCCU
 GGUGCCGGGCACGAUCGCCUUCACCGACGCCACAUCGAGGUCGACAUCACCUACGCGGA
 GUACUUCGAGAUGAGCGUGCGCCUGGCCGAGGCCAUGAAGCGGUACGGCCUGAACACCAA
 CCACCGGAUCGUGGUGUGCUCGGAGAACAGCCUGCAGUUCUUCAUGCCGGUGCUGGGCGC
 CCUCUUCAUCGGCGUGGCCGUCGCCCGCGGAACGACAUCUACAACGAGCGGGAGCUGCU
 GAACAGCAUGGGGAUCAGCCAGCCGACCGUGGUGUUCGUGAGCAAGAAGGGCCUJCAGAA
 GAUCCUGAACGUGCAGAAGAAGCUGCCCAUCAUCCAGAAGAUCAUCAUCAUGGACAGCAA
 GACCGACUACCAGGGCUUCCAGUCGAUGUACACGUUCGUGACCAGCCACCUCCCGCCGGG
 CUUCAACGAGUACGACUUCGUUCCCGGAGAGCUUCGACCGGGACAAGACCAUCGCCUGAU
 CAUGAACAGCAGCGGCAGCACCGGCCUGCCGAAGGGGGUGGCCUGCCGCACCGGACCGC
 CUGCGUGCGCUUCUCGCACGCCCGGGACCCCAUCUUCGGCAACCAGAUCAUCCCGGACAC
 CGCCAUCCUGAGCGUGGUGCCGUUCCACCACGGCUUCGGCAUGUUCACGACCCUGGGCUA
 CCUCAUCUGCGGCCUUCGGGGUGGUCCUGAUGUACCGGUUCGAGGAGGAGCUGUUCUGCG
 GAGCCUGCAGGACUACAAGAUCCAGAGCGCGCUGCUCGUGCCGACCCUGUUCAGCUUCU
 CGCCAAGAGCACCCUGAUCGACAAGUACGACCUUGUCGAACCUGCACGAGAUCCGACGCG
 GGGCGCCCCCGUGAGCAAGGAGGUGGGCGAGGCCGUGGCCAAGCGGUUCCACCUCCCGGG
 CAUCCGCCAGGGCUACGGCCUGACCGAGACCACGAGCGCGAUCCUGAUACCCCCGAGGG
 GGACGACAAGCCGGGCGCCGUGGGCAAGGUGGUCCGUUCUUCGAGGCCAAGGUGGUGGA
 CCUGGACACCGGCAAGACCCUGGGCGUGAACCAGCGGGGCGAGCUGUGCGUGCGGGGGCC
 GAUGAUCAUGAGCGGCUACGUGAACAACCCGGAGGCCACCAACGCCCUCAUCGACAAGGA
 CGGCUGGCUGCACAGCGGCGACAUCGCCUACUGGGACGAGGACGAGCACUUCUUCAUCGU
 CGACCGGCUGAAGUCGCUGAUCAAGUACAAGGGCUACCAGGUGGCGCCGGCCGAGCUGGA
 GAGCAUCCUGCUCCAGCACCCCAACAUCUUCGACGCCGGCGUGGCCGGGUGCCGGACGA
 CGACGCCGGCGAGCUGCCGGCCGCGGUGGUGGUCUGGAGCACGGCAAGACCAUGACGGA
 GAAGGAGAUCGUCGACUACGUGGCCAGCCAGGUGACCACCGCCAAGAAGCUGCGGGGCGG
 CGUGGUGUUCGUGGACGAGGUCCCGAAGGGCCUGACCGGGAAGCUCGACGCCGGAAGAU
 CCGCGAGAUCCUGAUCAAGGCCAAGAAGGGCGGCAAGAUCGCCGUGUAAgacuaguua
 agacugacua**GCCCGAUGGGCCUCCCAACGGGCCUCCUCCCCUCCUUGCACCG**agauua
 auAA
 AAAAAAugcauUAUGGCGGCCGUGUCCACCACGGAUUACCCUGGUGGACGCGGCC-3'

Figura 16

ppl.uc(GC) – ag – A64 – N32

gggagaaagcuugaggAUGGAGGACGCCAAGAACAUCAAGAAGGGCCCGGGCGCCUUCUA
 CCCGCUUGGAGGACGGGACCGCCGGCGAGCAGCUCCACAAGGCCAUGAAGCGGUACGCCCU
 GGUGCCGGGCACGAUCGCCUUCACCGACGCCACAUCGAGGUCCACAUCACCUACGCGGA
 GUACUUCGAGAUGAGCGUGCGCCUGGCCGAGGCCAUGAAGCGGUACGGCCUGAACACCAA
 CCACCGGAUCGUGGUGUGUCUGGAGAACAGCCUGCAGUUCUUCUUCGCGGUGCUGGGCGC
 CCUCUUCUUCGCGGUGGCCGUCGCCCCGGCGAACGACAUCUACAACGAGCGGGAGCUGCU
 GAACAGCAUGGGGAUCAGCCAGCCGACCGUGGUGUUCGUGAGCAAGAAGGGCCUGCAGAA
 GAUCCUGAACGUGCAGAAGAAGCUGCCCAUCAUCCAGAAGAUAUCAUCAUGGACAGCAA
 GACCGACUACCAGGGCUUCCAGUCGAUGUACACGUUCGUGACCAGCCACCUCGCCGGG
 CUUCAACGAGUACGACUUCGUCCCGGAGAGCUUCGACCGGGACAAGACCAUCGCCUUGAU
 CAUGAACAGCAGCGGCAGCACCGGCCUGCCGAAGGGGGUGGCCUGCCGCACCGGACCGC
 CUGCGUGCGCUUCUCGCACGCCCGGGACCCCAUCUUCGGCAACCAGAUAUCCCGGACAC
 CGCCAUCCUGAGCGUGGUGCCGUUCCACCACGGCUUCGGCAUGUUCACGACCCUGGGCUA
 CCUCAUCUGCGGUUCCGGGUGGUCCUGAUGUACCGGUUCGAGGAGGAGCUGUUCUGCG
 GAGCCUGCAGGACUACAAGAUCAGAGCGCGCUGCUGCGACCCUGUUCAGCUUCU
 CGCCAAGAGCACCCUGAUCGACAAGUACGACCUGUCGAACCUGCAGAGAUCCGACGGG
 GGGCGCCCCGUGAGCAAGGAGGUGGGCGAGGCCGUGGCCAAGCGGUUCCACCUCCGGG
 CAUCCGCCAGGGCUACGGCCUGACCGAGACCACGAGCGCGAUCCUGAUCACCCCGAGGG
 GGACGACAAGCCGGGCGCCGUGGGCAAGGUGGCCGUUCUUCGAGGCCAAGGUGGUGGA
 CCUGGACACCGGCAAGACCCUGGGCGUGAACAGCGGGGCGAGCUGUGCGUGCGGGGGCC
 GAUGAUAUGAGCGGCUACGUGAACAAACCCGGAGGCCACCAACGCCCUCAUCGACAAGGA
 CGGCUUGGUGCAGCAGCGGCGACAUCGCCUACUGGGACGAGGACGAGCACUUCUUCUUCGU
 CGACCGGCGAAGUCGUGAUAAGUACAAGGGCUACCAGGUGGCGCCGGCCGAGCUGGA
 GAGCAUCCUGCUCCACCACCCCAACAUCUUCGACCGCGGUGGCCCGGCGUGCCGGACGA
 CGACCGCGGCGAGCUGCCGGCCGCGGUGGUGGUGCUGGAGCACGGCAAGACCAUGACGGA
 GAAGGAGAUCGUCGACUACGUGGCCAGCCAGGUGACCACCGCCAAGAAGCUGCGGGCGG
 CGUGGUGUUCGUGGACGAGGUCCCGAAGGGCCUGACCGGGAAGCUCGACGCCCGGAAGAU
 CCGCGAGAUCUGAUAAGGCCAAGAAGGGCGGCAAGAUCGCCGUGUAAgacuaguaua
 agacugacua**GCCCGAUGGGCCUCCCAACGGGCCCUCUCCCUCCUUGCACCG**agauua
 auAAA
 AAAAAAgcauCCCCUCUAGACAAUUGGAAUCCAUA-3'

Figura 17

NY-ESO-1(GC) – ag – A64 – C30

GGGAGAAAGCUUACCAUGCAGGCCGAGGGCCGCGGCACCGGCGGCUCGACCGGCGACGCC
GACGGGCCCCGGCGGCCCGGGCAUCCCGGACGGCCCCGGGCGGGAACGCGGGCGGCCCGGGC
GAGGCCGGCGCCACCGGCGGGCGGGGCCCGCGGGGCGCCGGCGCCCGCCGGGCGAGCGGC
CCCGGCGGGGGCGCCCCGCGGGGCCCGCACGGCGGCGCCAGCGGCCUGAACGGGUGC
UGCCGGUGCGGCGCCCCGCGGCCCGGAGAGCCGGCUCUGGAGUUCUACCUUGGCCAUGCCG
UUCGCGACCCCGAUGGAGGCCGAGCUGGCCCGGCGGAGCCUGGCCAGGACGCCCCGCCG
CUGCCCCGUGCCGGGCGUGCUCCUGAAGGAGUUCACGGUGAGCGGCAACAUCUGACCAUC
CGGCUGACCGCCGCGGACCACCGGCAGCUGCAGCUGUCGAUCAGCAGCUGCCUCCAGCAG
CUGAGCCUGCUGAUGUGGAUCACCCAGUGCUUCCUGCCGGUGUCCUGGCCAGCCGCC
AGCGGCCAGCGCCGGUGAccacuaguauaagacugacua**GCCCGAUGGGCCUCCCAACG**
GGCCUCCUCCUCCUUGCACCGagauuaauAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA
AA
CCCCCCCCCucuagacaauuggaau

Figura 18

NY-ESO-1(GC)-ag-A64-C30-histonaSL

GGGAGAAAGCUUACCAUGCAGGCCGAGGGCCGCGGCACCGGCGGCUCGACCGGCGACGCC
GACGGGCCCCGGCGGCCCGGGCAUCCCGGACGGCCCCGGGCGGGAACGCGGGCGGCCCGGGC
GAGGCCGGCGCCACCGGCGGGCGGGGCCCGCGGGGCGCCGGCGCCCGCCGGGCGAGCGGC
CCCGGCGGGGGCGCCCCGCGGGGCCCGCACGGCGGCGCCAGCGGCCUGAACGGGUGC
UGCCGGUGCGGCGCCCCGCGGCCCGGAGAGCCGGCUCUGGAGUUCUACCUUGGCCAUGCCG
UUCGCGACCCCGAUGGAGGCCGAGCUGGCCCGGCGGAGCCUGGCCAGGACGCCCCGCCG
CUGCCCCGUGCCGGGCGUGCUCCUGAAGGAGUUCACGGUGAGCGGCAACAUCUGACCAUC
CGGCUGACCGCCGCGGACCACCGGCAGCUGCAGCUGUCGAUCAGCAGCUGCCUCCAGCAG
CUGAGCCUGCUGAUGUGGAUCACCCAGUGCUUCCUGCCGGUGUCCUGGCCAGCCGCC
AGCGGCCAGCGCCGGUGAccacuaguauaagacugacua**GCCCGAUGGGCCUCCCAACG**
GGCCUCCUCCUCCUUGCACCGagauuaauAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA
AA
CCCCCCCCCAAAGGCUCUUUCAGAGCCACCAAggaau

Figura 19

Survivina(GC)-ag-A64-C30-histonaSL

GGGAGAAAGCUUACCAUGGGCGCCCCACCCUGCCGCGCGGCCUGGCAGCCGUUCCUCAAG
GACCACCGCAUCUCGACCUUCAAGAACUGGCCGUUCCUGGAGGGCUGCGCGUGCACCCCG
GAGCGGAUGGCCGAGGCCGGCUUCAUCCACUGCCCCACCGAGAACGAGCCGGACCUGGCC
CAGUGCUUCUUCUGCUUCAAGGAGCUGGAGGGCUGGGAGCCGGACGACGCCGAUCGAG
GAGACAAGAAGCACAGCAGCGGCUGCGCCUUCUGAGCGUGAAGAAGCAGUUCGAGGAG
CUGACGCUCGGGGAGUUCUGAAGCUGGACCGGGAGCGGGCCAAGAACAAGAU CGGAAG
GAGACCAACAACAAGAAGAAGGAGUUCGAGGAGACCGCCAAGAAGGUGCGGCGGGCCAUC
GAGCAGCUGGCCGCAUGGACUGAccacuaguuaaagacugacua**GCCCGAUGGGCCUC**
CCAACGGGCCUCCUCCCCUCCUUGCACCGagauuaauAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA
AAAaugcauCCCCCCCCCCCC
CCCCCCCCCCCCCCCCCAAAGGCUCUUUUCAGAGCCACCAGAAU-3'

Figura 20

MAGE-C1(GC)-ag-A64-C30-histonaSL

GGGAGAAAGCUUACCAUGCAGUCCCCGCUGCAGGGCGAGGAGUUCAGAGCUCCCUGCAG
AGCCCCGUGUCCAUCUGCAGCUCCAGCACCCCCUCCAGCCUCCCGCAGAGCUUCCCCGAG
UCCAGCCAGUCCCCCCCCGAGGGCCCCGGUCCAGAGCCCCUGCACUCCCCGCAGAGCCCC
CCGGAGGGGAUGCACUCCAGAGCCCCUGCAGUCCCCCGAGAGCGCCCCGAGGGCGAG
GACUCCUCAGCCCCGUGCAGAUCCCCAGUCCCCGCUGGAGGGGGAGGACAGCCUUCUCC
AGCCUGCACUUCCCCAGUCCCCGCCCGAGUGGGAGGACAGCCUGAGCCCCCUCCACUUC
CCCCAGUUCCCGCCCCAGGGCGAGGACUUCAGUCCAGCCUGCAGUCCCCGUGAGCAUC
UGCUCAGCUCCACGAGCCUGUCCUCCCCAGAGCUUCCCGGAGUCCCCCGAGAGCCCCG
CCCGAGGGGCCGGCGCAGUCCCCCGUGCAGCGCCCCGUGAGCUCCUUCUUCAGCUACACC
CUGGCCUCCUCCUGCAGAGCUCCACGAGAGCCCCGAGAGCCCCGCCCGAGGGCCCCGCC
CAGUCCCCGCUGCAGAGCCCCGUCUCCAGCUUCCCCUCCAGCACCUCAGCUCCUCAGC
CAGUCCAGCCCCGUGUCCAGCUUCCCGUCCAGCACCUCAGCUCCUCAGCAAGAGCUCC
CCCGAGAGCCCCUGCAGUCCCCCGUGAUCAGCUUCUCCAGCUCCACGAGCCUCUCCCCG
UUCAGCGAGGAGUCCAGCUCCCCCGUCGACGAGUACACCAGCUCCAGCGACACCCUGCUG
GAGUCCGACAGCCUCACCGACUCCGAGAGCCUGAUCGAGAGCGAGCCCCUGUUCACCUAC
ACGUCGACGAGAAGGUGGACGAGCUGGCCCGGUUCCUGCUCCUGAAGUACCAGGUGAAG
CAGCCCAUCACCAAGGCCGAGAUGCUGACCAACGUCAUCUCCCGCUACACCGGCUACUUC
CCGGUGAUUCUCCGGAAGGCCGCGCGAGUUAUCGAGAUCUCUUCGGGAUCAGCCUGCGG
GAGGUGGACCCCCGACGACUCCUACGUCUUCGUGAACACGCUGGACCUCACCAGCGAGGGC
UGCCUGUCCGACGAGCAGGGGAUGAGCCAGAACC GCCUGCUCAUCCUGAUCCUGUCCAUC
AUCUUAUCAAGGGCACCUCACGCCAGCGAGGAGGUCUUCUGGGACGUGCUUCCGGGAUC
GGCGUGCGGGCCGGCCGCAGCACUUCGCCUUCGGGGAGCCCCGGGAGCUGCUGACCAAG
GUCUGGGUGCAGGAGCACUACCUCGAGUACCGCGAGGUGCCCAACAGCUCCCCGCCCCGG
UACGAGUUCUGUGGGGCCCCCCGCGCCACAGCGAGGUCUUAAGCGGAAGGUGGUGGAG
UUCUGGCCGAUGCUCAGAACACGGUCCCCAUACCUUCCCGUCCAGCUACAAGGACGCC
CUGAAGGACGUGGAGGAGCGGGCCCAGGCCAUCAUCGACACCACCGACGACUCCACGGCC
ACCGAGAGCGGUCUCCAGCUCCGUGAUGAGCCCCAGCUUCUCCAGCGAGUGAccacuaguu
auaagacugacua**GCCCCAUGGGCCUCCCAACGGGCCCUCCUCCCCUCCUUGCACCG**aga
uuauAAA
AAAAAAAAAUGCauCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCAAGGCUCUUUCAG
AGCCACCAGAAU-3'

Figura 21

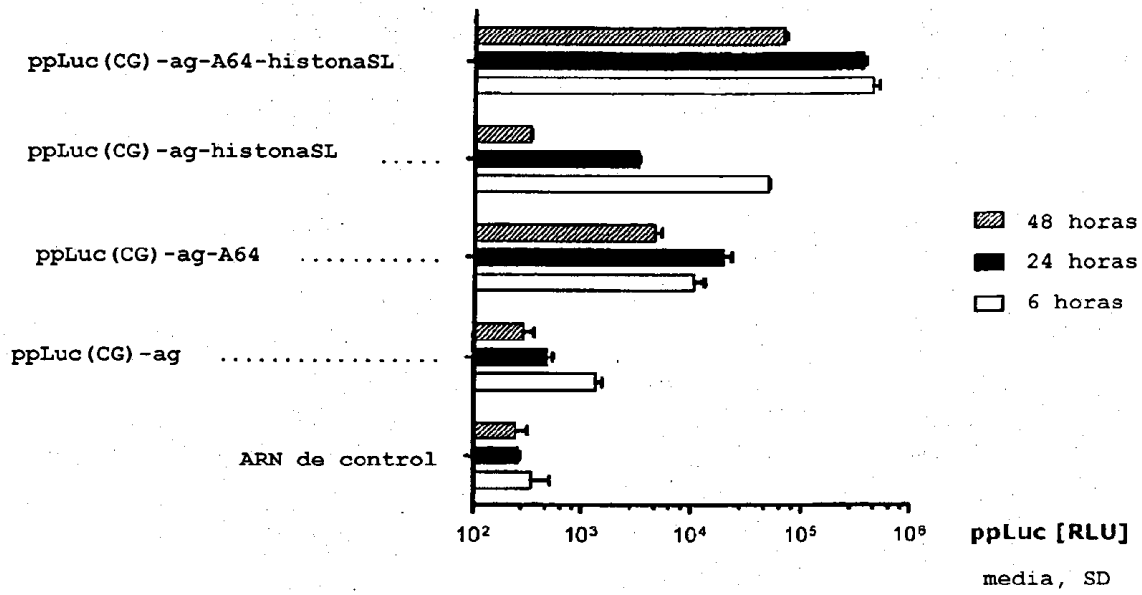


Figura 22

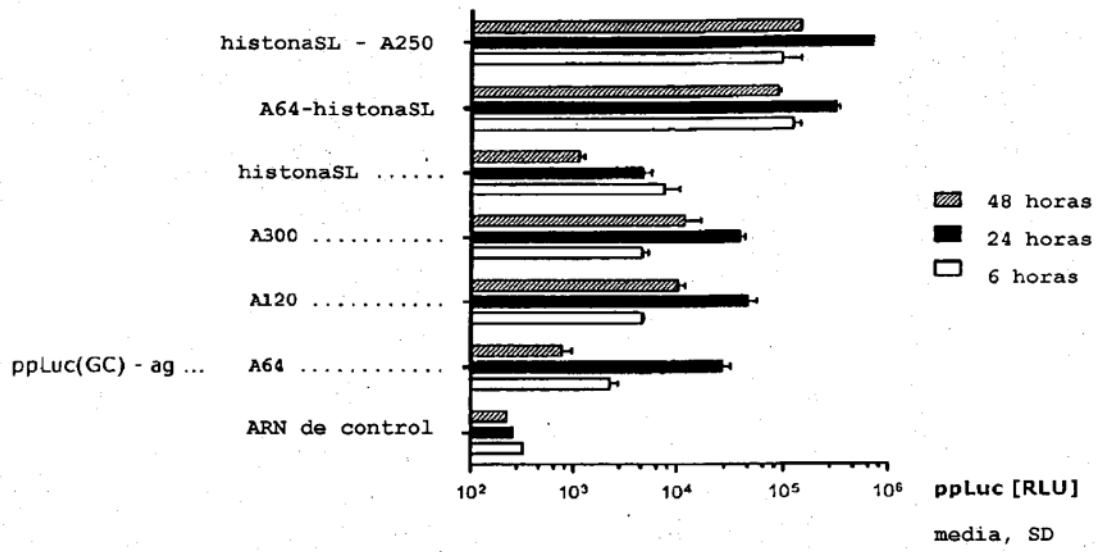


Figura 23

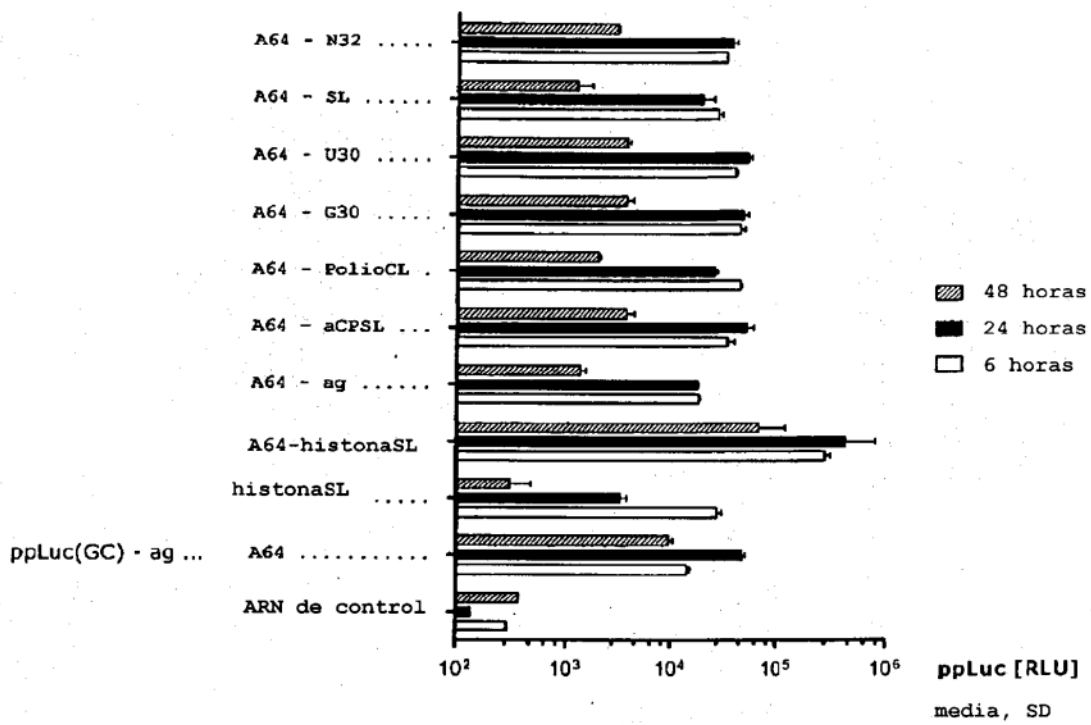


Figura 24

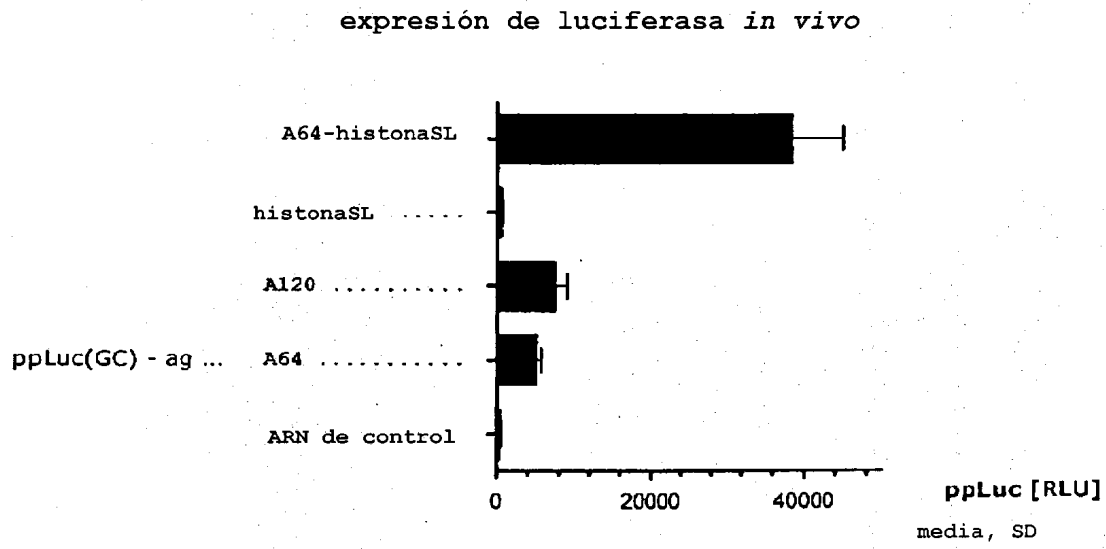


Figura 25

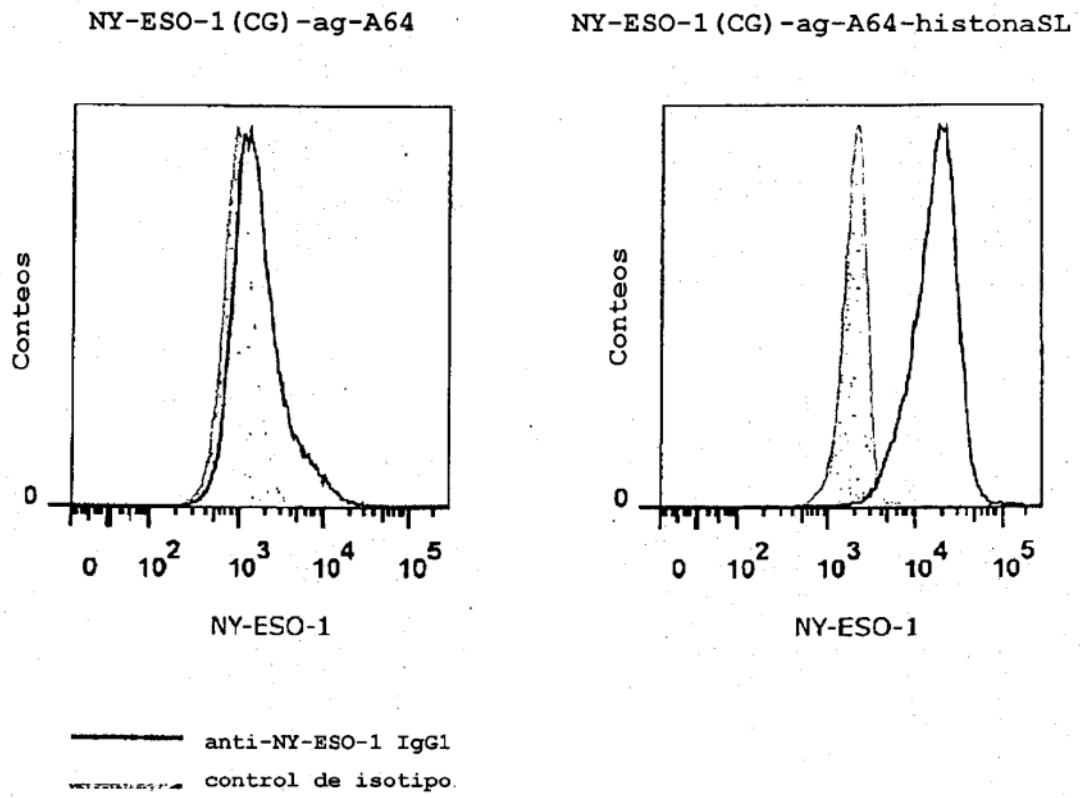


Figura 26

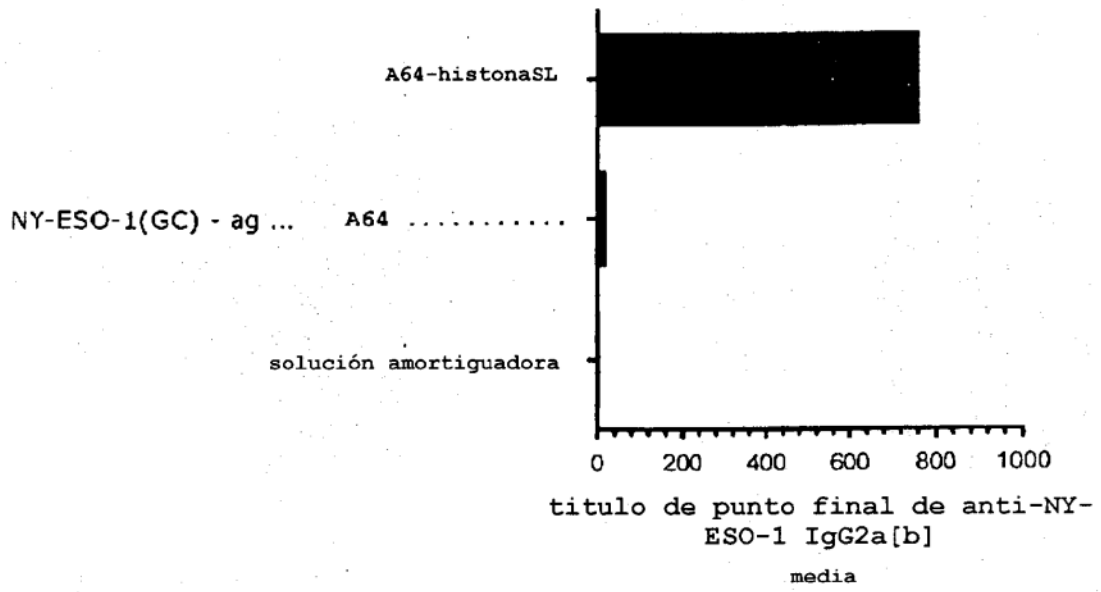


Figura 27