

İSTEMLER

1. Aşağıdakileri içeren kit veya parça kiti:

5 A) bir kodlama bölgesi içeren veya bunun için kodlama yapan bir nükleik asit, burada kodlama bölgesi, NY-ESO-1 tümör antijenini veya bunun bir fragmanını içeren en az bir peptidi veya proteini şifreler;

10 B) bir kodlama bölgesi içeren veya bunun için kodlama yapan bir nükleik asit, burada kodlama bölgesi, 5T4 tümör antijenini veya bunun bir fragmanını içeren en az bir peptidi veya proteini şifreler;

C) bir kodlama bölgesi içeren veya bunun için kodlama yapan bir nükleik asit, burada kodlama bölgesi, survivin tümör antijenini veya bunun bir fragmanını içeren en az bir peptidi veya proteini şifreler;

15 D) bir kodlama bölgesi içeren veya bunun için kodlama yapan bir nükleik asit, burada kodlama bölgesi, MAGE-C1 tümör antijenini veya bunun bir fragmanını içeren en az bir peptidi veya proteini şifreler; ve

20 E) bir kodlama bölgesi içeren veya bunun için kodlama yapan bir nükleik asit, burada kodlama bölgesi, MAGE-C2 tümör antijenini veya bunun bir fragmanını içeren en az bir peptidi veya proteini şifreler,

25 burada NY-ESO-1, 5T4, survivin, MAGE-C1 veya MAGE-C2 fragmanı, en az altı amino asit artığı uzunluğundadır; burada her nükleik asit A, B, C, D veya E - 5' 'ten 3' 'e doğrultuda - aşağıdakileri içerir veya bunlar için kodlama yapar

i)

a) kodlama bölgesi,

b) en az bir histon sap-ilmği ve

- sap1 [$N_{0-2}GN_{3-5}$], sap2 elemanı ile geri komplementer veya kısmen geri komplementerdir ve 5 ila 7 nükleotitlik ardışık bir sekanstır; burada N_{0-2} , 0 ila 2, tercihen 0 ila 1, daha fazla tercihen 1 N'lik ardışık bir sekanstır, buradaki her N birbirinden bağımsız olarak A, U, T, G ve C arasından seçilen bir nükleotit ya da bunun bir nükleotit analogu arasından seçilir; burada N_{3-5} , 3 ila 5, tercihen 4 ila 5, daha fazla tercihen 4 N'lik ardışık bir sekanstır, buradaki her N birbirinden bağımsız olarak A, U, T, G ve C arasından seçilen bir nükleotit ya da bunun bir nükleotit analogu arasından seçilir ve burada G, guanosin veya bunun bir analogudur ve sap2'de bunun komplementer nükleotidi sitidinin guanosin ile değiştirilmesi koşuluyla isteğe bağlı olarak bir sitidin veya bunun bir analogu ile değiştirilebilir;
- ilmik sekansı [$N_{0-4}(U/T)N_{0-4}$], sap1 ve sap2 elemanları arasında bulunur ve 3 ila 5 nükleotitlik, daha fazla tercihen 4 nükleotitlik ardışık bir sekanstır;
- buradaki her N_{0-4} birbirinden bağımsız olarak 0 ila 4, tercihen 1 ila 3, daha fazla tercihen 1 ila 2 N'lik ardışık bir sekanstır, buradaki her N birbirinden bağımsız olarak A, U, T, G ve C arasından seçilen bir nükleotit ya da bunun bir nükleotit analogu arasından seçilir; ve burada U/T, üridini ya da isteğe bağlı olarak timidini temsil eder;
- sap2 [$N_{3-5}CN_{0-2}$], sap1 elemanı ile geri komplementer veya kısmen geri komplementerdir ve 5 ila 7 nükleotitlik ardışık bir sekanstır; burada N_{3-5} , 3 ila 5, tercihen 4 ila 5, daha fazla tercihen 4 N'lik ardışık bir sekanstır, buradaki her N birbirinden bağımsız olarak A, U, T, G ve C arasından seçilen bir nükleotit ya da bunun bir nükleotit analogu arasından seçilir;
- burada N_{0-2} , 0 ila 2, tercihen 0 ila 1, daha fazla tercihen 1 N'lik ardışık bir sekanstır, buradaki her N birbirinden bağımsız olarak A, U, T, G

veya C arasından seçilen bir nükleotit ya da bunun bir nükleotit analogu arasından seçilir; ve

burada C, sitidin veya bunun bir analogudur ve sap1'de bunun komplementer nükleotidi guanosinin sitidin ile değiştirilmesi

- 5 koşuluyla isteğe bağlı olarak bir guanosin veya bunun bir analogu ile değiştirilebilir;

burada

sap1 ve sap2, birbirleri ile baz eşleşmesi yaparak bir geri komplementer sekans oluşturabilir, burada baz eşleşmesi, sap1 ve

- 10 sap2 arasında meydana gelebilir, veya

bir kısmen geri komplementer sekans oluşturabilir, burada sap1 ve sap2 arasında eksik bir baz eşleşmesi meydana gelebilir; ve

burada en az bir histon sap-ilmği, sap-ilmik bağlanma proteinine (SLBP) bağlanır; ve

- 15 burada her nükleik asit A, B, C, D veya E ayrıca en az 10 sitidin nükleotit içeren bir poli(C) sekansı içerir veya bunun için kodlama yapar.

MAGE-D4, MAGE-E1, MAGE-E2, MAGE-F1, MAGE-H1, MAGEL2, mammaglobin A, MART-1/melan-A, MART-2, MART-2/m, matris proteini 22, MC1R, M-CSF, ME1/m, mezotelin, MG50/PXDN, MMP11, MN/CA IX antijeni, MRP-3, MUC-1, MUC-2, MUM-1/m, MUM-2/m, MUM-3/m, miyosin sınıfı I/m, NA88-A, N-asetilglukozaminiltransferaz-V, Neo-PAP, Neo-PAP/m, NFYC/m, NGEP, NMP22, NPM/ALK, N-Ras/m, NSE, OA1, OFA-iLRP, OGT, OGT/m, OS-9, OS-9/m, osteokalsin, osteopontin, p15, p190 minör bcr-abl, p53, p53/m, PAGE-4, PAI-1, PAI-2, PAP, PART-1, PATE, PDEF, Pim-1-Kinaz, Pin-1, Pml/PARalpha, POTE, PRAME, PRDX5/m, prostein, proteinaz-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, survivin-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, tirosinaz, UPA, VEGFR1, VEGFR-2/FLK-1, WT1 ve bir lenfoid kan hücrelerinin immünoglobulin idiyotipi veya bir lenfoid kan hücrelerinin bir T hücresi reseptörü idiyotipi, veya adı geçern tümör antijeninin bir fragmanı, burada fragman, en az altı amino asit artıklık bir uzunluğa sahiptir.

proteinini şifrelemez, burada raportör protein, marker veya seçim proteini, NY-ESO-1, 5T4, survivin, MAGE-C1, MAGE-C2 veya istem 2 veya 3'e göre tanımlanan bir tümör antijeni değildir.

50 ila yaklaşık 250 adenosin nükleotitlik bir sekans, en fazla tercihen yaklaşık 60 ila yaklaşık 250 adenosin nükleotitlik bir sekans içerir.

C) bir kodlama bölgesi içeren veya bunun için kodlama yapan bir nükleik asit, burada kodlama bölgesi, survivin tümör antijenini veya bunun bir fragmanını içeren en az bir peptidi veya proteini şifreler;

5 D) bir kodlama bölgesi içeren veya bunun için kodlama yapan bir nükleik asit, burada kodlama bölgesi, MAGE-C1 tümör antijenini veya bunun bir fragmanını içeren en az bir peptidi veya proteini şifreler; ve

E) bir kodlama bölgesi içeren veya bunun için kodlama yapan bir nükleik asit, burada kodlama bölgesi, MAGE-C2 tümör antijenini
10 veya bunun bir fragmanını içeren en az bir peptidi veya proteini şifreler,

burada NY-ESO-1, 5T4, survivin, MAGE-C1 veya MAGE-C2 fragmanı, en az altı amino asit artığı uzunluğundadır; burada her nükleik asit A, B, C, D veya E - 5' 'ten 3' 'e doğrultuda -
15 aşağıdakileri içerir veya bunlar için kodlama yapar

i)

a) kodlama bölgesi,

b) en az bir histon sap-ilmği ve

c) bir poli(A) sekansı;

20 ya da

ii)

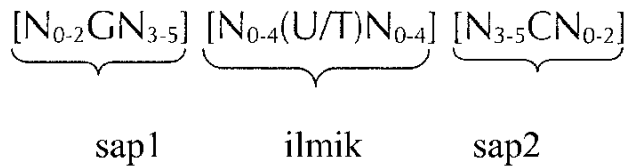
a) kodlama bölgesi,

b) bir poli(A) sekansı, ve

c) en az bir histon sap-ilmği;

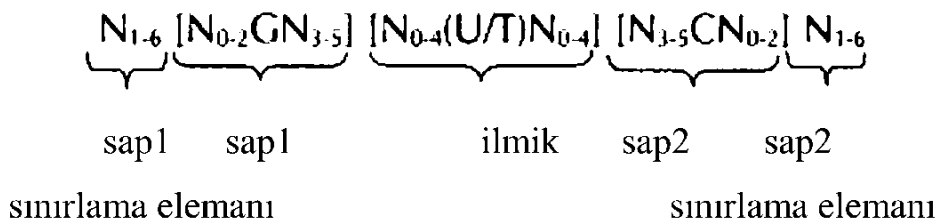
25 burada i) veya ii)'deki en az bir histon sap-ilmği, aşağıdaki formül (I) veya (II) arasından seçilir:

formül (I) (sap sınırlama elemanları olmayan sap-ilmik sekansı):



formül (II) (sap sınırlama elemanları ile sap-ilmik sekansı):

5



10 burada:

sap1 veya sap2 sınırlama elemanları N_{1-6} , 1 ila 6, tercihen 2 ila 6, daha fazla tercihen 2 ila 5, hatta daha fazla tercihen 3 ila 5, en fazla tercihen 4 ila 5 veya 5 N'lik ardışık bir sekanstır, buradaki her N birbirinden bağımsız olarak A, U, T, G ve C arasından seçilen bir nükleotit ya da

15 bunun bir nükleotit analogu arasından seçilir;

sap1 [$N_{0-2}GN_{3-5}$], sap2 elemanı ile geri komplementer veya kısmen geri komplementerdir ve 5 ila 7 nükleotitlik ardışık bir sekanstır; burada N_{0-2} , 0 ila 2, tercihen 0 ila 1, daha fazla tercihen 1 N'lik ardışık bir sekanstır, buradaki her N birbirinden bağımsız olarak A, U, T, G ve C arasından seçilen bir nükleotit ya da bunun bir nükleotit analogu arasından seçilir; burada N_{3-5} , 3 ila 5, tercihen 4 ila 5, daha fazla tercihen 4 N'lik ardışık bir sekanstır, buradaki her N birbirinden bağımsız olarak A, U, T, G ve C arasından seçilen bir nükleotit ya da bunun bir nükleotit analogu arasından seçilir ve burada G, guanosin

25 veya bunun bir analogudur ve sap2'de bunun komplementer nükleotidi

sitidinin guanosin ile değiştirilmesi koşuluyla isteğe bağlı olarak bir sitidin veya bunun bir analogu ile değiştirilebilir;

ilmik sekansı $[N_{0-4}(U/T)N_{0-4}]$, sap1 ve sap2 elemanları arasında bulunur ve 3 ila 5 nükleotitlik, daha fazla tercihen 4 nükleotitlik
5 ardışık bir sekanstır;

buradaki her N_{0-4} birbirinden bağımsız olarak 0 ila 4, tercihen 1 ila 3, daha fazla tercihen 1 ila 2 N'lik ardışık bir sekanstır, buradaki her N birbirinden bağımsız olarak A, U, T, G ve C arasından seçilen bir nükleotit ya da bunun bir nükleotit analogu arasından seçilir; ve

10 burada U/T, üridini ya da isteğe bağlı olarak timidini temsil eder;

sap2 $[N_{3-5}CN_{0-2}]$, sap1 elemanı ile geri komplementer veya kısmen geri komplementerdir ve 5 ila 7 nükleotitlik ardışık bir sekanstır; burada N_{3-5} , 3 ila 5, tercihen 4 ila 5, daha fazla tercihen 4 N'lik ardışık bir sekanstır, buradaki her N birbirinden bağımsız olarak A, U, T, G
15 ve C arasından seçilen bir nükleotit ya da bunun bir nükleotit analogu arasından seçilir;

burada N_{0-2} , 0 ila 2, tercihen 0 ila 1, daha fazla tercihen 1 N'lik ardışık bir sekanstır, buradaki her N birbirinden bağımsız olarak A, U, T, G veya C arasından seçilen bir nükleotit ya da bunun bir nükleotit

20 analogu arasından seçilir; ve

burada C, sitidin veya bunun bir analogudur ve sap1'de bunun komplementer nükleotidi guanosinin sitidin ile değiştirilmesi koşuluyla isteğe bağlı olarak bir guanosin veya bunun bir analogu ile değiştirilebilir;

25 burada

sap1 ve sap2, birbirleri ile baz eşleşmesi yaparak bir geri komplementer sekans oluşturabilir, burada baz eşleşmesi, sap1 ve sap2 arasında meydana gelebilir, veya

bir kısmen geri komplementer sekans oluşturabilir, burada sap1 ve sap2 arasında eksik bir baz eşleşmesi meydana gelebilir; ve burada en az bir histon sap-ilmği, sap-ilmik bağlanma proteinine (SLBP) bağlanır.

burada her nükleik asit A, B, C, D veya E - 5' 'ten 3' 'e doğrultuda - aşağıdakileri içerir veya bunlar için kodlama yapar

i)

a) kodlama bölgesi,

5 b) en az bir histon sap-ilmği ve

c) bir poli(A) sekansı;

ya da

ii)

a) kodlama bölgesi,

10 b) bir poli(A) sekansı, ve

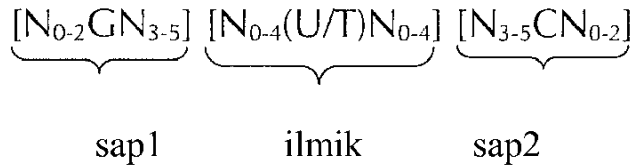
c) en az bir histon sap-ilmği;

burada i) veya ii)'deki en az bir histon sap-ilmği, aşağıdaki formül (I)

veya (II) arasından seçilir:

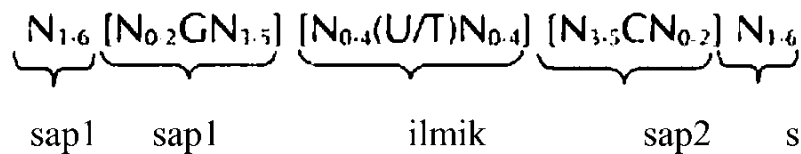
formül (I) (sap sınırlama elemanları olmayan sap-ilmik sekansı):

15



formül (II) (sap sınırlama elemanları ile sap-ilmik sekansı):

20



25

sınırlama elemanı

sınırlama elemanı

burada:

sap1 veya sap2 sınırlama elemanları N_{1-6} , 1 ila 6, tercihen 2 ila 6, daha fazla tercihen 2 ila 5, hatta daha fazla tercihen 3 ila 5, en fazla tercihen 4 ila 5 veya 5 N'lik ardışık bir sekanstır, buradaki her N birbirinden bağımsız olarak A, U, T, G ve C arasından seçilen bir nükleotit ya da bunun bir nükleotit analogu arasından seçilir;

sap1 [$N_{0-2}GN_{3-5}$], sap2 elemanı ile geri komplementer veya kısmen geri komplementerdir ve 5 ila 7 nükleotitlik ardışık bir sekanstır; burada N_{0-2} , 0 ila 2, tercihen 0 ila 1, daha fazla tercihen 1 N'lik ardışık bir sekanstır, buradaki her N birbirinden bağımsız olarak A, U, T, G ve C arasından seçilen bir nükleotit ya da bunun bir nükleotit analogu arasından seçilir; burada N_{3-5} , 3 ila 5, tercihen 4 ila 5, daha fazla tercihen 4 N'lik ardışık bir sekanstır, buradaki her N birbirinden bağımsız olarak A, U, T, G ve C arasından seçilen bir nükleotit ya da bunun bir nükleotit analogu arasından seçilir ve burada G, guanosin veya bunun bir analogudur ve sap2'de bunun komplementer nükleotidi sitidinin guanosin ile değiştirilmesi koşuluyla isteğe bağlı olarak bir sitidin veya bunun bir analogu ile değiştirilebilir;

ilmik sekansı [$N_{0-4}(U/T)N_{0-4}$], sap1 ve sap2 elemanları arasında bulunur ve 3 ila 5 nükleotitlik, daha fazla tercihen 4 nükleotitlik ardışık bir sekanstır;

buradaki her N_{0-4} birbirinden bağımsız olarak 0 ila 4, tercihen 1 ila 3, daha fazla tercihen 1 ila 2 N'lik ardışık bir sekanstır, buradaki her N birbirinden bağımsız olarak A, U, T, G ve C arasından seçilen bir nükleotit ya da bunun bir nükleotit analogu arasından seçilir; ve burada U/T, üridini ya da isteğe bağlı olarak timidini temsil eder;

- sap2 [$N_{3-5}CN_{0-2}$], sap1 elemanı ile geri komplementer veya kısmen geri komplementerdir ve 5 ila 7 nükleotitlik ardışık bir sekanstır; burada N_{3-5} , 3 ila 5, tercihen 4 ila 5, daha fazla tercihen 4 N'lik ardışık bir sekanstır, buradaki her N birbirinden bağımsız olarak A, U, T, G ve C arasından seçilen bir nükleotit ya da bunun bir nükleotit analogu arasından seçilir;
- burada N_{0-2} , 0 ila 2, tercihen 0 ila 1, daha fazla tercihen 1 N'lik ardışık bir sekanstır, buradaki her N birbirinden bağımsız olarak A, U, T, G veya C arasından seçilen bir nükleotit ya da bunun bir nükleotit analogu arasından seçilir; ve
- burada C, sitidin veya bunun bir analogudur ve sap1'de bunun komplementer nükleotidi guanosinin sitidin ile değiştirilmesi koşuluyla isteğe bağlı olarak bir guanosin veya bunun bir analogu ile değiştirilebilir;
- burada sap1 ve sap2, birbirleri ile baz eşleşmesi yaparak bir geri komplementer sekans oluşturabilir, burada baz eşleşmesi, sap1 ve sap2 arasında meydana gelebilir, veya bir kısmen geri komplementer sekans oluşturabilir, burada sap1 ve sap2 arasında eksik bir baz eşleşmesi meydana gelebilir; ve burada en az bir histon sap-ilmği, sap-ilmik bağlanma proteinine (SLBP) bağlanır.

ilgilidir. Kardiyovasküler hastalıklardan ve enfeksiyöz hastalıklardan ayrı olarak tümörlerin ve kanser hastalıklarının meydana gelmesi, modern toplumda en sık ölüm nedenlerinden biridir ve birçok durumda terapi ve takip eden rehabilitasyon önlemleri bağlamında önemli maliyetler ile bağlantılıdır. Tümörlerin ve kanser hastalıklarının tedavisi büyük ölçüde örneğin meydana gelen tümörün tipine, tedavi edilecek hastanın yaşına, kanser hücrelerinin hastadaki dağılımına, vb. bağlıdır. Günümüzde kanser terapisi geleneksel şekilde invazif operasyonlara ek olarak radyasyon terapisi veya kemoterapi kullanılarak gerçekleştirilir. Bununla birlikte bu geleneksel terapiler tipik olarak immün sisteme olağan dışı stres getirir ve bazı durumlarda ancak sınırlı dereceye kadar kullanılabilir. Ek olarak bu geleneksel terapilerin büyük kısmı, immün sistemin yenilenmesine izin vermek için tedaviler arasında uzun aralıklar gerektirir.

Bu nedenle bu tedavilerin immün sistem üzerindeki etkisini önlemek ya da en azından azaltmak amacıyla bu "geleneksel tedavilere" ek olarak son yıllarda destekleyici stratejiler araştırılmaktadır. Böyle bir destekleyici tedavi özellikle gen terapötik yaklaşımları veya genetik aşılama içerir, bunların ise tedavi için ya da bu tür geleneksel terapilerin desteklenmesi için oldukça umut vadeditici olduğu bulunmuştur.

Gen terapisi ve genetik aşılama, hastalıkların tedavisinde ve önlenmesinde hali hazırda kanıtlanmış ve genel olarak günlük tıbbi uygulama üzerinde, özellikle yukarıda bahsedilen hastalıkların tedavisi üzerinde önemli bir etki sergileyen moleküler tıp

yöntemleridir. Gen terapisi ve genetik aşılama olsun, her iki yöntem de nükleik asitlerin hastanın hücrelerine veya dokusuna sokulmasına ve ardından hücrelere veya doku içine sokulmuş nükleik asit tarafından kodlanan bilgilerin işlenmesine, yani arzu edilen polipeptitlerin (protein) ekspresyonuna dayanır.

Gen terapisi yaklaşımlarında tipik olarak DNA kullanılmakla birlikte RNA da son gelişmelerde bilinmektedir. Önemli olarak bu gen terapi yaklaşımlarının tamamında ister DNA, viral RNA ya da mRNA kullanılsın mRNA, şifrelenmiş proteinin sekans bilgileri için haberci görevi görür.

Genel olarak RNA, kararsız bir molekül olarak kabul edilir: RNazlar, çok boldur ve bilindiği gibi eylemsizleştirilmesi güçtür. Ek olarak RNA, kimyasal açıdan DNA'dan daha değişkendir. Bu nedenle belki de bir mRNA'nın bir ökaryotik hücre içindeki "varsayılan durumu"nun, göreceli bir stabilite ile karakterize edilmesi ve tek tek mRNA'ların bozulmasını hızlandırmak için spesifik sinyallerin gerekli olması şaşırtıcıdır. Bu bulgunun başlıca nedeni, mRNA'nın hücre içindeki bozulmasına hemen hemen sadece eksonükleazların katalizörlük etmesidir. Bununla birlikte ökaryotik mRNA'ların uçları, spesifik terminal yapılar ve bunların bağlantılı proteinleri tarafından bu enzimlere karşı korunur: 5' ucunda bir m⁷GpppN CAP ve tipik olarak 3' ucunda bir poli(A) sekansı. Bu terminal modifikasyonların çıkarılması bu nedenle mRNA bozulması için hızı sınırlandırıcı kabul edilir. Alfa-globin mRNA'nın 3' UTR'sinde stabilize edici bir eleman karakterize edilmiş olmasına rağmen ökaryotik mRNA'ların dönüşümünü etkileyen RNA sekansları tipik olarak genellikle

deadenilasyonu hızlandırmak suretiyle bir bozulma promoteri görevi görür (Meyer, S., C. Temme, ve arkadaşları (2004), Crit Rev Biochem Mol Biol 39(4): 197-216'da incelenmiştir).

- 5 Yukarıda bahsedildiği gibi ökaryotik mRNA'ların 5' uçları tipik olarak transkripsiyon sonrasında modifiye edilerek metile edilmiş bir CAP yapısı, örn m⁷GpppN taşınması sağlanır. RNA uç uca eklenmesi, stabilizasyonu ve taşınmasında oynadığı rollerin yanı sıra CAP yapısı, 40S ribozomal ünitenin translasyon başlangıcı sırasında mRNA'nın 5' ucuna görevlendirilmesini anlamlı şekilde güçlendirir. Son bahsedilen fonksiyon, CAP yapısının ökaryotik başlatma faktörü kompleksi eIF4F tarafından tanınmasını gerektirir. Poli(A) sekansı ek olarak mRNA'lara 40S alt ünite görevlendirmesinin arttırılması yoluyla translasyonu uyarır, bu etki ise poli(A) bağlama proteininin (PABP) müdahalesini gerektirir. PABP'nin ise son zamanlarda CAP bağlı eIF4F kompleksinin bir parçası olan eIF4G ile fiziksel olarak etkileşime girdiği gösterildi. Böylelikle başlıklı, poliadenile edilmiş mRNA'lar üzerinde kapalı halkalı bir translasyon başlatma modeli öngörüldü (Michel, Y. M., D. Poncet, ve arkadaşları (2000), J Biol Chem 275(41): 32268-76.).
- 10
- 15
- 20

- Hemen hemen tüm ökaryotik mRNA'lar, yaygın klivaj/poliadenilasyon mekanizması yoluyla bunların 3' ucuna ilave edilen böyle bir poli(A) sekansı ile sonlanır. 3' ucunda bir poli(A) sekansının varlığı, ökaryotik mRNA'ların en fark edilen özelliklerinden biridir. Klivaj sonrasında pre-mRNA'ların büyük kısmı, replikasyona bağımlı histon transkriptleri haricinde, poliadenile olmuş bir kuyruk edinir. Bu bağlamda 3' ucunun işlenmesi,
- 25

mRNA'ların çekirdekten sitoplazmaya taşınmasını teşvik eden ve mRNA'ların stabilitesini ve translasyonunu etkileyen bir nükleer ko-transkripsiyonel bir işlemdir. Bu 3' ucunun oluşması, klivaj/poliadenilasyon mekanizması tarafından yürütülen iki kademeli bir reaksiyonda meydana gelir ve mRNA öncülerinde (pre-mRNA'larda) iki sekans elemanının varlığına bağlıdır; yüksek oranda konserve edilmiş bir heksanükleotid AAUAAA (poliadenilasyon sinyali) ve aşağı akış tarafında G/U açısından zengin bir sekans. Birinci adımda pre-mRNA'lar, bu iki eleman arasında klivaj edilir. Birinci adıma sıkıca bağlı bir ikinci adımda yeni oluşturulan 3' ucu, 200-250 adenilattan oluşan bir poli(A) sekansı ilave edilerek uzatılır, bu ise daha sonra mRNA taşınması, stabilitesi ve translasyonu dahil olmak üzere mRNA metabolizmasının tüm yönlerini etkiler (Dominski, Z. ve W. F. Marzluff (2007), *Gene* 396(2): 373-90.).

15

Bu kuralın bilinen tek istisnası, bir poli(A) sekansı yerine bir histon sap-ilmği ile son bulan, replikasyona bağımlı histon mRNA'lardır. Örnek histon sap-ilmği sekansları, Lopez ve arkadaşları (Dávila López, M., & Samuelsson, T. (2008), *RNA* (New York, N.Y.), 14(1), 1-10. doi:10.1261/rna.782308.)'de tarif edilir.

20

Histon pre-mRNA'lardaki sap-ilmikleri tipik olarak histon aşağı akış elemanı (HDE) olarak bilinen, purin açısından zengin bir sekans takip eder. Bu pre-mRNA'lar, sap-ilmğin yaklaşık olarak 5 nükleotit aşağı akışında tek bir endonükleolitik klivaj tarafından çekirdek içinde işlenir, buna ise U7 snRNA'nın HDE ile baz çiftleşmesi yoluyla U7 snRNP katalizörlük eder. Histon sap-ilmği yapısını ve histon aşağı akış elemanını (HDE) (U7 snRNP'nin bağlanma sahası) içeren 3'-UTR

25

sekansı genellikle histon 3' işleme sinyali olarak adlandırılır (bakınız örn. Chodchoy, N., N. B. Pandey, ve arkadaşları (1991). *Mol Cell Biol* 11(1): 497-509.).

- 5 Yeni sentezlenen DNA'nın kromatin içinde paketlenmesi gerekliliği nedeniyle histon sentezi, hücre döngüsü ile uyumlu şekilde regüle edilir. S fazı sırasında histon proteinlerinin artan sentezi, histon genlerinin transkripsiyonel aktivasyonunun yanı sıra histon mRNA düzeylerinin transkripsiyon sonrası regülasyonu yoluyla sağlanır.
- 10 Histon sap-ilmliğinin, histon ekspresyonu regülasyonunun transkripsiyon sonrası tüm adımları için elzem olduğu gösterilebildi. Verimli işleme, mRNA'nın sitoplazma içine ihracı, poliribozomlar üzerine yükleme ve mRNA stabilitesinin regülasyonu için bu gereklidir.
- 15 Yukarıdaki bağlamda 32 kDa'lık bir protein tanımlanmış olup, bu, hem çekirdek hem sitoplazmada histon mesajlarının 3' ucunda histon sap-ilmliği ile bağlantılıdır. Bu sap-ilmik bağlanma proteininin (SLBP) ekspresyon düzeyi, hücre döngüsü ile regüle edilir ve histon mRNA
- 20 düzeylerinin arttığı S fazı sırasında en yüksektir. SLBP, histon pre-mRNA'nın U7 snRNP tarafından verimli 3' ucu işleme için gereklidir. İşlem tamamlandıktan sonra SLBP, olgun histon mRNA'ların ucunda sap-ilmik ile bağlantılı kalır ve bunların sitoplazma içinde histon proteinleri halinde translasyonunu uyarır. (Dominski, Z. ve W. F. Marzluff (2007), *Gene* 396(2): 373-90). İlginçtir ki SLBP'nin RNA bağlanma alanı, metazoa ve protozoa boyunca konserve edilir (Dávila López, M., & Samuelsson, T. (2008), *RNA* (New York, N.Y.), 14(1), 1-10. doi:10.1261/rna.782308) ve bunun, histon sap-ilmliği sekansına

bağlanmasının, sap-ilmik yapısına bağımlı olduğu ve minimum bağlanma sahasının, sap-ilmğin 5' en az 3 nükleotidini ve 3' 2 nükleotidini ihtiva ettiği gösterilebildi (Pandey, N. B., ve arkadaşları (1994), *Molecular and Cellular Biology*, 14(3), 1709-1720 and Williams, A. S., & Marzluff, W. F., (1995), *Nucleic Acids Research*, 23(4), 654-662.). Histon genleri genel olarak mRNA'nın bir histon sap-ilmği ile sonuçlanmasına yol açan "replikasyona bağımlı" veya mRNA'nın bunun yerine bir poli(A) kuyruğu taşımasına yol açan "değiştirme tipi" şeklinde sınıflandırılmasına rağmen bazı çok nadir durumlarda hem bir histon sap-ilmği hem de poli(A) veya oligo(A) 3' ihtiva eden, doğal yoldan meydana gelen mRNA'lar da tanımlanmıştır. Sanchez ve arkadaşları, *Xenopus* oojenez sırasında histon mRNA'nın histon sap-ilmğine 3' eklenmiş, doğal yoldan meydana gelen oligo(A) kuyruklarının etkisini, raportör gen olarak *Lusiferaz* kullanarak incelediler ve oligo(A) kuyruğunun, oojenez sırasında histon mRNA'yı susturan translasyon represyon mekanizmasının aktif bir parçası olduğunu ve bunun çıkarılmasının, histon mRNA'ların translasyonunu aktiveştiren mekanizmanın bir parçası olduğunu keşfettiler (Sanchez, R. ve W. F. Marzluff (2004), *Mol Cell Biol* 24(6): 2513-25).

Ek olarak pre-mRNA işleme düzeyinde replikasyona bağımlı histonların regüle edilmesi ve mRNA stabilitesi gereklilikleri, marker protein alfa Globini kodlayan suni yapılar kullanılarak ve globin geninin, intronsuz histon genlerine karşılık intronlar ihtiva etmesinden faydalanılarak araştırıldı. Bu amaçla alfa globin kodlama sekansını bir histon sap-ilmği sinyalinin (histon sap-ilmğini histon aşağı akış elemanı takip eder) ve bir poliadenilasyon sinyalinin takip ettiği

yapılar üretildi (Whitelaw, E., ve arkadaşları (1986). *Nucleic Acids Research*, 14(17), 7059-7070.; Pandey, N. B., & Marzluff, W. F. (1987). *Molecular and Cellular Biology*, 7(12), 4557-4559.; Pandey, N. B., ve arkadaşları (1990). *Nucleic Acids Research*, 18(11), 3161-
5 3170).

Başka bir yaklaşımda Lüscher ve arkadaşları, bir rekombinant histon H4 geninin hücre döngüsüne bağımlı regülasyonunu araştırdı. H4 kodlama sekansını, bir histon sap-ilmği sinyalinin ve bir
10 poliadenilasyon sinyalinin takip ettiği, iki işleme sinyalinin ise şans eseri bir galaktokinaz kodlama sekansı ile ayrıldığı yapılar üretildi (Lüscher, B. ve arkadaşları, (1985). *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 82(13), 4389-4393).

15 Ek olarak Stauber ve arkadaşları, histon H4 mRNA düzeylerine hücre döngüsü regülasyonu vermek için gerekli minimal sekansı tanımladı. Bu araştırmalar için seçim markeri Ksantin:guanin fosforibosil transferaz (GPT) için bir kodlama sekansı, önünde bir histon sap-ilmği, ardından bir poliadenilasyon sinyali içeren yapılar kullanıldı
20 (Stauber, C. ve arkadaşları, (1986). *EMBO J*, 5(12), 3297-3303).

Histon pre-mRNA işlemlerini inceleyen Wagner ve arkadaşları, histon pre-mRNA'ların klivajı için gerekli faktörleri, bir histon sap-ilmği ile bir poliadenilasyon sinyali arasına EGFP getiren, böylelikle EGFP'nin
25 sadece histon pre-mRNA işlemlerinin kesintiye uğradığı durumda eksprese edildiği bir raportör yapısı kullanarak tanımladı (Wagner, E. J. ve arkadaşları, (2007). *Mol Cell* 28(4), 692-9).

- Belirtmek gerekirse poliadenile edilmiş mRNA'nın translasyonu genellikle 3' poli(A) sekansının 5' CAP yakınına getirilmesini gerektirir. Buna, poli(A) bağlanma proteini ile ökaryotik başlatma faktörü eIF4G arasındaki protein-protein etkileşimi aracılık eder.
- 5 Replikasyona bağımlı histon mRNA'larla ilgili olarak benzer bir mekanizma ortaya çıkarıldı. Bu bağlamda Gallie ve arkadaşları, histon sap-ilmığının, translasyon verimliliğini güçlendirmesi ve verimli düzeyde translasyon oluşturmak için bir 5'-CAP'ye ortak bağımlı olması açısından poli(A) sekansına fonksiyonel olarak benzer
- 10 olduğunu gösterir. Transfekte edilmiş Çin hamster yumurtalık hücrelerini kullanarak bir raportör mRNA'nın translasyonunu arttırmak için histon sap-ilmığının yeterli ve gerekli olduğunu, ancak optimum fonksiyon sağlamak için 3'-terminaline konulması gerektiğini gösterdiler. Bu nedenle diğer mRNA'lar üzerindeki poli(A)
- 15 kuyruğuna benzer şekilde bu histon mRNA'ların 3' ucu, in vivo translasyon için elzem görünür ve bir poli(A) kuyruğuna fonksiyonel açıdan benzerdir (Gallie, D. R., Lewis, N. J., & Marzluff, W. F. (1996), *Nucleic Acids Research*, 24(10), 1954-1962).
- 20 Ek olarak SLBP'nin sitoplazmik histon mRNA'ya bağlandığı ve bunun translasyonu için gerekli olduğu gösterilebildi. SLBP, eIF4G ile direkt olarak etkileşime girmemesine rağmen histon mRNA'nın translasyonu için gerekli alan, yeni tanımlanan SLIP1 proteini ile etkileşime girer. İleri adımda SLIP1, eIF4G ile etkileşime girer ve histon mRNA'nın
- 25 sirkülerize olmasına ve poliadenile edilmiş mRNA'ların translasyonuna benzer bir mekanizma ile histon mRNA'nın verimli translasyonunun desteklenmesine izin verir.

Yukarıda bahsedildiği gibi gen terapisi yaklaşımları normalde kodlama bilgilerini hücre içine transfer etmek için DNA kullanır, bu ise daha sonra bir mRNA'nın doğal yoldan meydana gelen elemanlarını, özellikle 5'-CAP yapısını ve 3' poli(A) sekansını taşıyan mRNA halinde transkripte edilerek şifrelenen terapötik veya antijenik proteinin ekspresyonu sağlanır.

Bununla birlikte birçok durumda bu nükleik asitlerin hastanın hücreleri veya dokusu içine sokulmasına ve ardından bu nükleik asitler tarafından kodlanan arzu edilen polipeptitlerin ekspresyonuna dayalı ekspresyon sistemleri, ister DNA ister RNA kullanılsın, verimli bir terapiye izin verebilecek, arzu edilen veya hatta gerekli ekspresyon düzeyini sergilemez.

Bilinen teknikte bugüne kadar şifrelenmiş bir proteinin ekspresyon verimini, özellikle in vitro ve/veya in vivo geliştirilmiş ekspresyon sistemlerini kullanarak arttırmak için farklı çalışmalar yapıldı. Genel olarak bilinen teknikte tarif edilen, ekspresyonu arttırmaya yönelik yöntemler geleneksel olarak spesifik promoterler ve karşılık gelen regülasyon elemanları ihtiva eden ekspresyon vektörlerinin veya kasetlerinin kullanılmasına dayanır. Bu ekspresyon vektörleri veya kasetleri tipik olarak belirli hücre sistemleri ile sınırlı olduğundan bu ekspresyon sistemlerinin, farklı hücre sistemlerinde kullanılmaya adapte edilmeleri gerekir. Adapte edilen bu ekspresyon vektörleri veya kasetleri daha sonra genellikle hücrelerin içine transfekte edilir ve tipik olarak spesifik hücre çizgisine bağımlı şekilde işleme tabi tutulur. Bu nedenle asıl olarak belirli hücre tipleri için spesifik promoterlerden ve regülasyon elemanlarından bağımsız olarak,

şifrelenmiş proteinleri bir hedef hücre içinde, hücrede bulunan sistemler yoluyla eksprese edebilen nükleik asit moleküllerine öncelik verilir. Bu bağlamda mRNA'yı stabilize eden elemanlar, mRNA'nın translasyon verimliliğini arttıran elemanlardan ayırt edilebilir.

5

Kodlama sekansları açısından optimize edilmiş ve genel olarak böyle bir amaç için uygun olan mRNA'lar, WO 02/098443 (CureVac GmbH) başvurusunda tarif edilir. Örneğin WO 02/098443, genel formda stabilize edilmiş ve kodlama bölgelerinde translasyon için optimize edilmiş mRNA'ları tarif eder. WO 02/098443 de sekans modifikasyonlarının belirlenmesine yönelik bir yöntem açıklar. WO 02/098443 ek olarak sekansların guanin/sitosin (G/C) içeriğini arttırmak için mRNA sekanslarında adenin ve ürasil nükleotitlerinin ikame edilmesine yönelik olasılıkları tarif eder. WO 02/098443'e göre bu ikameler ve G/C içeriğini arttırmaya yönelik adaptasyonlar, gen terapötik uygulamaları için ve ayrıca kanser veya enfeksiyöz hastalıkların tedavisinde genetik aşılar için kullanılabilir. Bu bağlamda WO 02/098443 genel olarak bu modifikasyonlar için bir baz sekans olarak, modifiye edilmiş mRNA'nın biyolojik açıdan aktif en az bir peptidi veya polipeptidi kodladığı, bunun ise tedavi edilecek hastada, 10 örneğin hiç translasyon yapılmadığı ya da yetersiz veya kusurlu şekilde translasyon yapıldığı sekanslardan bahseder. Alternatif olarak WO 02/098443, bu tür modifikasyonlar için bir baz sekans olarak, antijenleri, örn. tümör antijenlerini veya viral antijenleri kodlayan mRNA'lar önerir. 25

Şifrelenmiş bir proteinin ekspresyonunu arttırmaya yönelik başka bir yaklaşımda WO 2007/036366 başvurusu, uzun poli(A) sekanslarının

(özellikle 120 bp'den uzun) ve beta globin geninin en az iki 3' translasyon yapılmamış bölgesinin kombinasyonunun, mRNA stabilitesi ve translasyon aktivitesi üzerindeki olumlu etkisini tarif eder.

5

WO 2011/069529 A1 (CureVac GmbH), NY-ESO-1, 5T4, survivin, MAGE-C1 ve MAGE-C2 dahil olmak üzere tümör antijenlerini şifreleyen nükleik asitlerin spesifik kombinasyonlarını açıklar. Russel ve arkadaşları, beta-globin, alfa-globin ve histonların, 3' UTR içinde
10 bir RNA'yı stabilize edebilen elemanlara sahip olduğunu öğretir. Bu dokümanların hiçbirisi, şifrelenmiş tümör antijenlerinin ekspresyonunu, bunların sinerjistik etkisi yoluyla arttırmak amacıyla poli(A) sekanslarının ve histon sap-ilmiklerinin birleştirilmesini önermez.

15 Bununla birlikte bu eski bilinen teknik dokümanlarının tamamı, gen terapisi yaklaşımları için oldukça verimli araçlar sağlamaya çalışmış ve ek olarak mRNA stabilitesini ve translasyon aktivitesini geliştirmiş olmakla birlikte RNA bazlı uygulamaların, DNA aşılara ve DNA bazlı gen terapötik yaklaşımlarına göre genel olarak daha düşük
20 stabiliteye sahip olması problemi hala devam etmektedir. Buna göre gen terapisi yaklaşımları ve genetik aşılama yönelik ya da yukarıda tartışılan geleneksel tedavilere destekleyici bir terapi olarak, şifrelenmiş proteinlerin in vivo daha iyi sağlanmasına, örn. daha da geliştirilmiş mRNA stabilitesine ve/veya translasyon aktivitesine izin
25 veren, tercihen gen terapisine ve genetik aşılama yönelik geliştirilmiş araçların sağlanmasına bu konuda hala ihtiyaç vardır.

Ek olarak teknikte kaydedilen tüm ilerlemelere rağmen şifrelenmiş bir

peptidin veya proteinin hücre dışı sistemlerde, hücrelerde veya organizmalarda verimli ekspresyonu (rekombinant ekspresyon) hala zorlayıcı bir problemdir.

- 5 Mevcut buluşun temelinde yatan amaç bu nedenle kanser veya tümör hastalıklarının terapötik veya profilaktik tedavisinde genetik aşılama kullanılmaya yönelik, bilinen teknikten bilinen bu tür nükleik asitlere göre, tercihen mRNA'nın daha iyi stabilizasyonu ve/veya böyle bir mRNA'nın translasyon verimliliğinin artırılması
- 10 yoluyla şifrelenmiş bir proteinin ekspresyonunu arttırmaya yönelik ilave ve/veya alternatif yöntemler sağlamaktır.

Bu amaç, ekteki istemlerin konusu ile çözülür. Özellikle mevcut buluşun temelinde yatan amaç, bir birinci yöne göre aşağıdakileri

- 15 içeren buluşa ait bir kit veya parça kiti ile çözülür:

- A) bir kodlama bölgesi içeren veya bunun için kodlama yapan bir nükleik asit, burada kodlama bölgesi, NY-ESO-1 tümör antijenini veya bunun bir fragmanını içeren en az bir peptidi veya proteini şifreler;
- 20 B) bir kodlama bölgesi içeren veya bunun için kodlama yapan bir nükleik asit, burada kodlama bölgesi, 5T4 tümör antijenini veya bunun bir fragmanını içeren en az bir peptidi veya proteini şifreler;
- C) bir kodlama bölgesi içeren veya bunun için kodlama yapan bir nükleik asit, burada kodlama bölgesi, survivin tümör antijenini
- 25 veya bunun bir fragmanını içeren en az bir peptidi veya proteini şifreler;
- D) bir kodlama bölgesi içeren veya bunun için kodlama yapan bir nükleik asit, burada kodlama bölgesi, MAGE-C1 tümör antijenini

veya bunun bir fragmanını içeren en az bir peptidi veya proteini şifreler; ve

E) bir kodlama bölgesi içeren veya bunun için kodlama yapan bir nükleik asit, burada kodlama bölgesi, MAGE-C2 tümör antijenini

5 veya bunun bir fragmanını içeren en az bir peptidi veya proteini şifreler,

burada NY-ESO-1, 5T4, survivin, MAGE-C1 veya MAGE-C2 fragmanı, en az altı amino asit artığı uzunluğundadır;

10 burada her nükleik asit sekansı A, B, C, D veya E - 5' 'ten 3' 'e doğrultuda - aşağıdakileri içerir veya bunlar için kodlama yapar

i)

a) kodlama bölgesi,

b) en az bir histon sap-ilmliği ve

c) bir poli(A) sekansı;

15 ya da

ii)

a) kodlama bölgesi,

b) bir poli(A) sekansı, ve

c) en az bir histon sap-ilmliği;

20 burada i) veya ii)'deki en az bir histon sap-ilmliği, burada tanımlandığı gibi aşağıdaki formül (I) veya (II) arasından seçilir;

burada

sap1 ve sap2, bir geri komplementer sekans oluşturarak, ki burada sap1 ve sap2 arasında baz eşleşmesi meydana gelebilir, ya da kısmen

25 geri komplementer sekans oluşturarak, ki burada sap1 ve sap2 arasında eksik bir baz eşleşmesi meydana gelebilir, birbirleri ile baz eşleşmesi yapabilir; ve

burada her nükleik asit A, B, C, D veya E ayrıca en az 10 sitiklin nükleotidi içeren bir poli(C) sekansı içerir veya bunun için kodlama yapar.

Adı geçen kit veya parça kiti tercihen adı geçen şifrelenmiş peptitlerin veya proteinlerin ekspresyonunu arttırmak için uygundur.

Bir histon sap-ilmği dışında sap-ilmik sekansları (histon genlerinden, özellikle H1, H2A, H2B, H3 ve H4 familyalarının histon genlerinden türetilir) da teknikte bilinir.

10

Bu bağlamda burada tanımlandığı gibi nükleik asitlerin, özellikle mevcut buluşun birinci yönüne uygun, buluşa ait kitin veya parça kitinin nükleik asitlerinin en azından kısmen DNA veya RNA sentezi yoluyla, tercihen burada tarif edildiği gibi üretilmesi ya da izole edilmiş nükleik asitler olması özellikle tercih edilir.

15

Mevcut buluş, her ikisi de doğada alternatif mekanizmaları temsil etmelerine rağmen, bir poli(A) sekansı ile en az bir histon sap-ilmğinin kombinasyonunun, sinerjistik şekilde hareket ettiğinin, çünkü bu kombinasyonun, bu elemanların herhangi bir ile gözlemlenen düzeyin üzerine protein ekspresyonunu arttırdığının mevcut kaşifler tarafından sürpriz şekilde keşfedilmesine dayanır. Poli(A) ile en az bir histon sap-ilmğinin kombinasyonunun sinerjistik etkisi, poli(A) ile histon sap-ilmğinin sırasından ve poli(A) sekansının uzunluğundan bağımsız şekilde görülür.

25

Bu nedenle burada tanımlandığı gibi nükleik asit sekansları, özellikle buluşa ait kitin veya parça kitinin nükleik asit sekansları, diğerlerinin

yanı sıra, a) bir tümör antijeni veya bunun bir fragmanını, varyantını veya türevini içeren en az bir peptit veya proteini şifreleyen bir kodlama bölgesi; b) en az bir histon sap-ilmği ve, c) bir poli(A) sekansı veya poliadenilasyon sekansı içerir veya bunlar için kodlama yapar; tercihen adı geçen şifrelenmiş peptidin veya proteinin ekspresyon düzeyinin arttırılmasına yöneliktir. Bazı düzeneklerde şifrelenmiş protein, bir histon proteini olmaması, özellikle H4, H3, H2A ve/veya H2B histon familyasından bir histon proteini ya da bunların, histon (benzeri) fonksiyonu muhafaza eden, yani bir nükleozom oluşturan bir fragmanı, türevi veya varyantının olmaması tercih edilebilir. Ayrıca şifrelenmiş protein tipik olarak H1 histon familyasının bir histon bağlayıcı proteinine karşılık gelmez. Burada tanımlandığı gibi nükleik asit molekülleri, özellikle buluşa ait kitin veya parça kitinin nükleik asit molekülleri tipik olarak bir fare histon geninin, özellikle bir fare histon geni H2A'nın ve ayrıca en fazla tercihen fare histon geni H2A614'ün 5' ve/veya özellikle 3' regülatör sinyallerini ihtiva etmez. Özellikle bunlar, bir fare histon geninden, özellikle fare histon geni H2A'dan ve en fazla tercihen fare histon geni H2A614'ten bir histon sap-ilmği ve/veya bir histon sap-ilmği işleme sinyali ihtiva etmez.

Ayrıca burada tanımlandığı gibi nükleik asitler, özellikle buluşa ait kitin veya parça kitinin nükleik asitleri tipik olarak bir raportör protein (örn. Lusiferaz, GFP, EGFP, β -Galaktosidaz, özellikle EGFP), galaktokinaz (galK) ve/veya marker veya seçim proteini (örn. alfa-Globin, galaktokinaz ve Ksantin:Guanin fosforibosil transferaz (GPT)) veya bir bakteriyel raportör protein, örn. kloramfenikol asetil

transferaz (CAT) veya başka bakteriyel antibiyotik direnç proteinleri, örn. bakteriyel neo geninden türetilenleri, (a) elemanı içinde sağlamaz.

Bir raportör, marker veya seçim proteininin tipik olarak buna göre bir
 5 tümör antijeni olmayacağı anlaşılır. Bir raportör, marker veya seçim
 proteini veya bunun altında yatan gen yaygın şekilde bakterilerde,
 hücre kültüründe, hayvanlarda veya bitkilerde bir araştırma aracı
 olarak kullanılır. Bunlar, bunları (tercihen heterolog şekilde) eksprese
 eden organizmalara, ölçülebilen veya seçime izin veren, kolayca
 10 tanımlanabilir bir özellik verir. Spesifik olarak marker veya seçim
 proteinleri, seçilebilen bir fonksiyon sergiler. Tipik olarak bu seçim,
 marker veya raportör proteinleri, insanlarda veya başka memelilerde
 doğal yoldan meydana gelmez, başka organizmalardan, özellikle
 bakterilerden veya bitkilerden türetilir. Buna göre memeliler dışındaki
 15 türlerden, özellikle insan haricindekilerden kaynaklanan, seçim,
 marker veya raportör fonksiyonuna sahip proteinler tercihen mevcut
 buluşa göre bir "tümör antijeni" görevi görme özelliğine sahip bir
 protein olarak anlaşılmaz. Özellikle bir seçim, marker veya raportör
 proteini, transforme edilmiş hücrelerin örn. flüoresan veya başka
 20 spektroskopik tekniklere ve antibiyotiklere yönelik direnç dayalı in
 vitro deneylerle tanımlanmasına izin verir. Bu nedenle transforme
 edilmiş hücrelere bu tür özellikler kazandıran seçim, raportör veya
 marker genleri tipik olarak in vivo buna göre bir tümör antijeni görevi
 gören bir protein olarak anlaşılmaz.

25

Her durumda raportör, marker veya seçim proteinleri genellikle herhangi bir tümör antijenik özelliği vermez ve bu nedenle tümör hastalıklarını terapötik olarak tedavi etmeyi sağlayan bir immünolojik

etki vermez. Herhangi bir raportör, marker veya seçim proteini yine de (kendi raportör, seçim veya marker fonksiyonuna ek olarak) bunu yapsa bile bu raportör, marker veya seçim proteini tercihen mevcut buluşun anlamında bir "tümör antijeni" olarak anlaşılmaz.

5

Buna karşılık mevcut buluşa göre bir tümör antijeni görevi gören bir protein veya peptit (özellikle H1, H2A, H2B, H3 ve H4 familyalarından histon genleri hariç) tipik olarak bir seçim, marker veya raportör fonksiyonu sergilemez. Yine de herhangi bir "tümör antijeni" (kendi tümör antijenik fonksiyonuna ek olarak) bunu yapsa bile böyle bir tümör antijeninin tercihen mevcut buluşun anlamında bir "seçim, marker veya raportör protein" olduğu anlaşılmaz.

En fazla tercihen buna göre tümör antijeni görevi gören bir proteinin, memelilerden, özellikle insanlardan, özellikle memeli tümörlerinden türetilmesi ve seçim, marker veya raportör protein olarak nitelendirilmemesi anlaşılır. Özellikle bu tümör antijenleri, memeli, özellikle insan tümörlerinden türetilir. Bu tümör antijenik proteinlerinin antijenik olduğu anlaşılır, çünkü bunlar, süjenin immün sisteminin, TH1 ve/veya TH2 immün tepkileri yoluyla süjenin tümör hücreleri ile savaşması sağlanacak şekilde süjenin immün tepkisinin tetiklenmesi suretiyle süjeyi tedavi etme amaçlıdır. Buna göre bu antijenik tümör proteinleri tipik olarak süjenin kanser tipini karakterize eden memeli, özellikle insan proteinleridir.

25

Buna göre en az bir peptidi veya proteini şifreleyen kodlama bölgesi (a)'nın, en azından (b) en az bir histon sap-ilmğine karşı heterolog olması tercih edilir. Başka bir deyişle mevcut buluş bağlamında

- "heterolog", en az bir sap-ilmik sekansının, burada tanımlandığı gibi, özellikle buluşa ait kitin veya parça kitinin nükleik asitlerinin (a) elemanının (tümör antijenik) proteinini veya peptidini şifreleyen spesifik genin bir (regülatör) sekansı (örn. 3'UTR'de) olarak doğal yoldan meydana gelmediği anlamına gelir. Buna göre adı geçen nükleik asitlerin her birinin (histon) sap ilmiği tercihen buluşa ait nükleik asidin (a) elemanının kodlama bölgesini içeren dışındaki bir genin 3' UTR'sinden türetilir. Örn. (a) elemanının kodlama bölgesi, nükleik asitler heterolog ise bir histon proteinini veya bunun (bir histon proteininin fonksiyonunu muhafaza eden) bir fragmanını, varyantını veya türevini şifrelemeyecektir, ancak bir histon (benzeri) fonksiyonu dışında bir biyolojik fonksiyon, tercihen tümör antijenik fonksiyon veren başka bir peptidi veya (aynı veya başka bir türün) sekansını şifreleyecektir, örn. memeli, özellikle insan tümörlerine karşı aşılama bağlamında, örn. bir tümör antijenik fonksiyon veren, bu şekilde tercihen buluşa ait nükleik asit tarafından şifrelenen tümör antijenini eksprese eden süjenin tümör hücrelerine karşı bir immünolojik reaksiyonu tetikleyen bir proteini şifreleyecektir.
- 20 Bu bağlamda burada tanımlandığı gibi, özellikle buluşa ait kitin veya parça kitinin nükleik asitleri, 5'-ten 3'-e doğrultuda aşağıdakileri içerir veya bunlar için kodlama yapar:
- a) bir tümör antijeni veya bunun bir fragmanını, varyantını veya türevini içeren en az bir peptidi veya proteini şifreleyen bir kodlama bölgesi;
 - b) histon sap-ilmiğine 3' bir histon aşağı akış elemanı (HDE) olmayan en az bir histon sap-ilmiği
 - c) bir poli(A) sekansı veya bir poliadenilasyon sinyali.

"Histon aşağı akış elemanı" (HDE) terimi, doğal yoldan meydana gelen histon sap-ilmiklerinin 3' yaklaşık 15 ila 20 nükleotidinden oluşan, histon pre-mRNA'nın olgun histon mRNA halinde işlenmesinde rol oynayan U7 snRNA için bağlanma sahasını temsil eden, purin açısından zengin bir polinükleotit grubuna karşılık gelir. 5 Orneğin deniz kestanelerinde HDE, CAAGAAAGA'dır (Dominski, Z. ve W. F. Marzluff (2007), Gene 396(2): 373-90).

Ayrıca burada tanımlandığı gibi, özellikle buluşa ait kitin veya parça 10 kitinin nükleik asitleri, bir intron içermez.

Alternatif olarak burada tanımlandığı gibi, özellikle buluşa ait kitin veya parça kitinin nükleik asit sekansları, 5' 'ten 3' 'e aşağıdakileri içerir veya bunlar için kodlama yapar:

- 15 a) tercihen bir tümör antijeni veya bunun bir fragmanını, varyantını veya türevini içeren en az bir peptidi veya proteini şifreleyen bir kodlama bölgesi;
- c) bir poli(A) sekansı; ve
- b) en az bir histon sap-ilmliği.

20

Burada tanımlandığı gibi, özellikle buluşa ait kitin veya parça kitinin nükleik asit sekansları, örn. herhangi bir (tek iplikçikli veya iki iplikçikli) DNA, tercihen bunlarla sınırlı olmamakla birlikte örn. genomik DNA, plazmid DNA, tek iplikçikli DNA molekülleri, iki 25 iplikçikli DNA molekülleri arasından seçilen uygun bir nükleik asit içerir ya da örn. bir PNA'dan (peptit nükleik asidi) seçilebilir veya örn. herhangi bir (tek iplikçikli veya iki iplikçikli) RNA, tercihen bir mesajcı RNA (mRNA); vb. arasından seçilebilir. Adı geçen nükleik

asit sekansları ayrıca bir viral RNA (vRNA) içerebilir. Bununla birlikte adı geçen nükleik asit sekansları, bir viral RNA olmayabilir veya bir viral RNA ihtiva etmeyebilir. Daha spesifik olarak burada tanımlandığı gibi, özellikle buluşa ait kitin veya parça kitinin nükleik asit sekansları, viral sekans elemanları, örn. viral güçlendiriciler veya viral promotorlar (örn. eylemsizleştirilmiş viral promotor veya sekans elemanları, daha spesifik olarak değiştirme stratejileri ile eylemsizleştirilmiş) ya da başka viral sekans elemanları ya da viral veya retroviral nükleik asit sekansları ihtiva etmeyebilir. Daha spesifik olarak adı geçen nükleik asit sekansları, bir retroviral veya viral vektör veya modifiye edilmiş bir retroviral veya viral vektör olmayabilir.

Her durumda burada tanımlandığı gibi, özellikle buluşa ait kitin veya parça kitinin nükleik asit sekansları, modifiye edilmiş ya da aktifleştirilmiş olabilen veya olmayabilen bir güçlendirici ve/veya promotor sekans ihtiva edebilir veya etmeyebilir. Güçlendirici ve veya promotor, bitkilerde eksprese edilebilir olabilir veya olmayabilir ve/veya ökaryotlarda eksprese edilebilir olabilir veya olmayabilir ve/veya prokaryotlarda eksprese edilebilir olabilir veya olmayabilir. Burada tanımlandığı gibi, özellikle buluşa ait kitin veya parça kitinin nükleik asit sekansları, (kendi kendine uç uca eklenen) bir ribozimi şifreleyen bir sekans ihtiva edebilir veya etmeyebilir.

Spesifik düzeneklerde burada tanımlandığı gibi, özellikle buluşa ait kitin veya parça kitinin nükleik asit sekansları, kendi kendine replike olan bir RNA (replikon) olabilir veya içerebilir. Tercihen burada tanımlandığı gibi, özellikle buluşa ait kitin veya parça kitinin nükleik

asit sekansları, bir plazmid DNA veya bir RNA, özellikle bir mRNA'dır.

Mevcut buluşun birinci yönünün belirli düzeneklerinde burada tanımlandığı gibi, özellikle buluşa ait kitin veya parça kitinin nükleik asitleri, özellikle uygun bir in vitro transkripsiyon vektörü içinde in vitro transkripsiyon için uygun nükleik asitlerden oluşan nükleik asit sekanslarıdır (örn. bir plazmid veya in vitro transkripsiyon için T3, T7 veya Sp6 promoterleri gibi spesifik promoterler içeren lineer bir nükleik asit sekansıdır).

Mevcut buluşun birinci yönünün başka özellikle tercih edilen düzeneklerinde burada tanımlandığı gibi, özellikle buluşa ait kitin veya parça kitinin nükleik asitleri, bir ekspresyon sisteminde (örn. bir ekspresyon vektörü veya plazmid), özellikle bir prokaryotik (örn. E. coli gibi bakteriler) veya ökaryotik (örn. CHO hücreleri gibi memeli hücreleri, maya hücreleri veya böcek hücreleri veya bitkiler veya hayvanlar gibi bütün organizmalar) ekspresyon sistemi içinde transkripsiyon ve/veya translasyon için uygun nükleik asitlerden oluşur.

"Ekspresyon sistemi", peptitlerin, proteinlerin veya RNA'nın, özellikle mRNA'nın üretilmesi için uygun bir sistem (hücre kültürü veya bütün organizmalar anlamına gelir (rekombinant ekspresyon).

25

Mevcut buluşun birinci yönüne göre, burada tanımlandığı gibi, özellikle buluşa ait kitin veya parça kitinin nükleik asit sekansları, burada tanımlandığı gibi en az bir histon sap-ilmği içerir veya bunun

için kodlama yapar. Mevcut buluş bağlamında böyle bir histon sap-
 ilmiği genel olarak (bunun bir histon sap-ilmliği olup olmadığına
 bakılmaksızın) tipik olarak histon genlerinden türetilir ve iki komşu,
 kısmen veya tamamen geri komplementer sekansların molekül için
 5 baz eşleşmesini içerir, bu şekilde bir sap-ilmik oluşturulur. Bir sap-
 ilmik, tek iplikçikli DNA'da veya daha yaygın şekilde RNA'da
 meydana gelebilir. Yapı ayrıca bir firkete veya firkete ilmiği olarak
 bilinir ve genellikle bir ardışık sekans içinde bir saptan ve bir
 (terminal) ilmikten oluşur, burada sap, sap-ilmik yapısının ilmiğini
 10 oluşturan, bir tür aralayıcı olarak kısa bir sekans ile ayrılan,
 birbirlerine komşu, kısmen veya tamamen geri iki komplementer
 sekans tarafından oluşturulur. Birbirlerine komşu, kısmen veya
 tamamen geri iki komplementer sekans, örn. sap ilmik elemanları sap1
 ve sap2 olarak tanımlanabilir. Birbirlerine komşu, kısmen veya
 15 tamamen geri bu iki komplementer sekans, örn. sap ilmik elemanları
 sap1 ve sap2, birbirleri ile baz-çiftler oluşturarak, ardışık sekans
 üzerinde sap ilmik elemanları sap1 ve sap2 arasına konumlanan kısa
 sekans tarafından oluşturulan, terminal uçta eşleşmemiş bir ilmik
 içeren, iki iplikçikli bir nükleik asit sekansı grubu elde edildiğinde sap
 20 ilmik oluşturulur. Eşleşmemiş ilmik böylelikle tipik olarak bu sap
 ilmik elemanlarının herhangi biri ile baz eşleşmesi yapamayan bir
 nükleik asit bölgesini temsil eder. Nihai lollipop biçimindeki yapı,
 birçok RNA ikincil yapısının temel bir yapı blokudur. Bu yüzden bir
 sap-ilmik yapısının şekli, nihai sap ve ilmik bölgelerinin stabilitesine
 25 bağlıdır; buradaki ilk ön gereklilik tipik olarak kendi üzerine geri
 katlanarak eşleşmiş bir ikili iplikçik oluşturabilen bir sekansın var
 olmasıdır. Eşleşmiş sap ilmik elemanlarının stabilitesi, uzunluk, yanlış
 eşleşme sayısı veya ihtiva ettiği çıkıntılar (tipik olarak özellikle uzun

bir iki iplikçikli grupta az miktarda yanlış eşleşme tolere edilebilir) ve eşleşmiş bölgenin baz kompozisyonu ile belirlenir. Mevcut buluş bağlamında 3 ila 15 bazlık bir ilmik uzunluğu düşünülebilirken daha fazla tercih edilen ilmik uzunluğu, 3-10 baz, daha fazla tercihen 3 ila 8, 3 ila 7, 3 ila 6 ya da hatta daha fazla tercihen 4 ila 5 baz ve en fazla tercihen 4 bazdır. İki iplikçikli yapıyı oluşturan sap sekansı tipik olarak 5 ila 10 bazlık, daha fazla tercihen 5 ila 8 baz arasında bir uzunluğa sahiptir.

- 10 Mevcut buluş bağlamında bir histon sap-ilmiği tipik olarak histon genlerinden (örn. H1, H2A, H2B, H3, H4 histon familyalarından gelen genlerden) türetilir ve birbirlerine komşu, kısmen veya tamamen geri iki komplementer sekansın, bir sap-ilmik oluşturacak şekilde molekül içi baz eşleşmesini içerir. Tipik olarak bir histon 3' UTR sap-ilmiği,
- 15 histon mRNA'ların nükleositoplazmik taşınmasında ve sitoplazma içinde stabilitenin ve translasyon verimliliğinin regülasyonunda rol oynayan bir RNA elemanıdır. Metazoan histon genlerinin mRNA'ları, poliadenilasyon ve bir poli-A kuyruğu taşımaz, bunun yerine 3' uç işlemi, yüksek oranda konserve edilen bu sap-ilmik ile yaklaşık 20
- 20 nükleotit aşağı akış tarafında bulunan, purin açısından zengin bir bölge (histon aşağı akış elemanı veya HDE) arasındaki bir sahada meydana gelir. Histon sap-ilmiği, 31 kDa'lık bir sap-ilmik bağlanma proteini (SLBP - ayrıca histon firkete bağlanma proteini veya HBP olarak adlandırılır) tarafından bağlanır. Bu histon sap-ilmiği yapıları
- 25 tercihen mevcut buluş tarafından, histon genleri içinde doğal yoldan meydana gelmeyen (yani transforme edilmemiş canlı organizmalarda/hücrelerde), ancak - buluşa göre - birleştirilerek suni, heterolog bir nükleik asit sağlayan başka sekans elemanları ve yapıları

ile kombinasyon halinde kullanılır. Buna göre mevcut buluş özellikle bir histon sap-ilmği yapısının, histon genlerinde veya metazoan histon genlerinde meydana gelmeyen ve histonlar dışındaki proteinler için kodlama yapan genlerin işlevsel ve/veya regülatör sekans 5 bölgelerinden (transkripsiyonu ve/veya translasyonu etkileyen) izole edilmiş başka heterolog sekans elemanları ile suni (doğal olmayan) bir kombinasyonunun, avantajlı etkiler sağladığının bulunmasına dayanır. Buna göre buluşun bir yönü, burada tanımlandığı gibi, özellikle buluşa ait kitin veya parça kitinin nükleik asitlerinde, bir histon sap-ilmği 10 yapısının, metazoan histon genlerinde meydana gelmeyen bir poli(A) sekansı I (bir kodlama bölgesinin 3' terminali) ile kombinasyonunu sağlar. Buluşun tercih edilen başka bir yönüne göre bir histon sap-ilmği yapısının, bir tümör antijenik proteini için kodlama yapan ve tercihen metazoan histon genlerinde meydana gelmeyen bir kodlama 15 bölgesi ile bir kombinasyonu, burada tanımlandığı gibi, özellikle buluşa ait kitin veya parça kitininkiler sunulur (kodlama bölgesi ve histon sap-ilmği sekansı heterologtur). Bu tümör antijenik proteinlerinin, tümör hastalıklarından muzdarip memelilerde, tercihen insanlarda meydana gelmesi tercih edilir. Yine daha fazla tercih edilen 20 bir düzenekte burada tanımlandığı gibi, özellikle buluşa ait kitin veya parça kitinin nükleik asitlerinin (a), (b) ve (c) olmak üzere tüm elemanları, birbirlerine heterologtur ve üç farklı kaynaktan, örn. (a) bir insan geninden gelen tümör antijenik proteini kodlama bölgesinden, (b) bir metazoan, örn. memeli, insan dışı veya insan, histon geninin translasyon yapılmamış bölgesinden histon sap ilmiğinden ve (c) örn. 25 bir histon geni dışındaki ve bu nükleik asidin (a) elemanına uygun tümör antijeni kodlama bölgesinin translasyon yapılmamış bölgesi

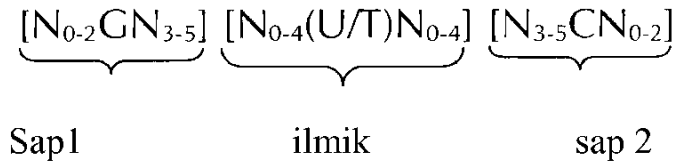
dışındaki bir genin translasyon yapılmamış bir bölgesinden poli(A) sekansından suni şekilde birleştirilir.

Bir histon sap ilmiği böylelikle tercihen fonksiyonel olarak tanımlanırsa, kendi doğal bağlanma ortağına, sap-ilmik bağlanma proteinine (SLBP - ayrıca firkete bağlanma proteini veya HBP olarak adlandırılır) bağlanma özelliği sergileyen/bunu muhafaza eden, burada tarif edildiği gibi bir sap-ilmik yapısıdır.

10 Mevcut buluşa göre istem 1'in (b) bileşenine uygun histon sap-ilmiği sekansı, bir fare histon proteininden türetilmez. Daha spesifik olarak histon sap ilmiği sekansı, fare histon geni H2A614'ten türetilmez. Ayrıca buluşa ait nükleik asit, bir fare histon sap ilmiği sekansı veya fare histon geni H2A614'ü ihtiva edemez. Ayrıca burada tanımlandığı gibi, özellikle buluşa ait kitin veya parça kitinin nükleik asit sekansları, bir sap-ilmik işleme sinyali, daha spesifik olarak bir fare histon işleme sinyali ihtiva edemez ve en spesifik şekilde buluşa ait nükleik asit sekansı, en az bir memeli histon geni ihtiva edebilse bile fare sap ilmik işleme sinyali H2kA614'ü ihtiva edemez. Bununla 15 birlikte en az bir memeli histon geni, WO 01/12824'ün SEK.KİM.NO. 7'si olamaz.

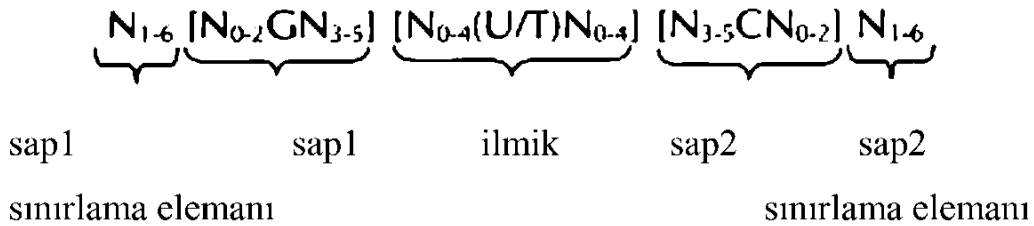
Buluşa ait birinci yöne göre burada tanımlandığı gibi, özellikle buluşa ait kitin veya parça kitinin nükleik asit sekansları, tercihen aşağıdaki formüller (I) veya (II)'den en az birine göre en az bir histon sap-ilmiği 25 sekansı içerir veya bunun için kodlama yapar:

formül (I) (sap sınırlama elemanları olmayan sap-ilmik sekansı):



formül (II) (sap sınırlama elemanları ile sap-ilmik sekansı):

5



10 burada:

sap1 veya sap2 sınırlama elemanları N_{1-6}

1 ile 6, tercihen 2 ile 6, daha fazla tercihen 2 ile 5, hatta daha fazla tercihen 3 ile 5, en fazla tercihen 4 ile 5 veya 5 N'lik ardışık bir sekanstır, buradaki her N birbirinden bağımsız olarak A, U, T, G ve C arasından seçilen bir nükleotit ya da bunun bir nükleotit analogu arasından seçilir;

15 arasında seçilen bir nükleotit ya da bunun bir nükleotit analogu
arasından seçilir;

sap1 [N₀₋₂GN₃₋₅]

sap2 ile geri komplementer veya kısmen geri komplementerdir ve 5 ila 7 nükleotitlik ardışık bir sekanstır; burada N_{0-2} , 0 ila 2, tercihen 0 ila 1,

20 daha fazla tercihen 1 N'lik ardışık bir sekanstır, buradaki her N birbirinden bağımsız olarak A, U, T, G ve C arasından seçilen bir nükleotit ya da bunun bir nükleotit analogu arasından seçilir; burada N_{3-5} , 3 ila 5, tercihen 4 ila 5, daha fazla tercihen 4 N'lik ardışık bir sekanstır, buradaki her N birbirinden bağımsız olarak A, U, T, G ve C

25 arasında seçilen bir nükleotit ya da bunun bir nükleotit analogu
arasından seçilir ve burada G, guanosin veya bunun bir analogudur ve

sap2'de bunun komplementer nükleotidi sitidinin guanosin ile değiştirilmesi koşuluyla isteğe bağlı olarak bir sitidin veya bunun bir analogu ile değiştirilebilir;

ilmik sekansı $[N_{0-4}(U/T)N_{0-4}]$

- 5 sap1 ve sap2 elemanları arasında bulunur ve 3 ila 5 nükleotitlik, daha fazla tercihen 4 nükleotitlik ardışık bir sekanstır; buradaki her N_{0-4} birbirinden bağımsız olarak 0 ila 4, tercihen 1 ila 3, daha fazla tercihen 1 ila 2 N'lik ardışık bir sekanstır, buradaki her N birbirinden bağımsız olarak A, U, T, G ve C arasından seçilen bir nükleotit ya da bunun bir
- 10 nükleotit analogu arasından seçilir; ve burada U/T, üridini ya da isteğe bağlı olarak timidini temsil eder;

sap2 $[N_{3-5}CN_{0-2}]$

- sap1 ile geri komplementer veya kısmen geri komplementerdir ve 5 ila 7 nükleotitlik ardışık bir sekanstır; burada N_{3-5} , 3 ila 5, tercihen 4 ila 5, daha fazla tercihen 4 N'lik ardışık bir sekanstır, buradaki her N birbirinden bağımsız olarak A, U, T, G ve C arasından seçilen bir nükleotit ya da bunun bir nükleotit analogu arasından seçilir; burada
- 15 N_{0-2} , 0 ila 2, tercihen 0 ila 1, daha fazla tercihen 1 N'lik ardışık bir sekanstır, buradaki her N birbirinden bağımsız olarak A, U, T, G veya C arasından seçilen bir nükleotit ya da bunun bir nükleotit analogu arasından seçilir ve burada C, sitidin veya bunun bir analogudur ve
- 20 sap1'de bunun komplementer nükleotidi guanosinin sitidin ile değiştirilmesi koşuluyla isteğe bağlı olarak bir guanosin veya bunun bir analogu ile değiştirilebilir;

- 25 burada

sap1 ve sap2, bir geri komplementer sekans oluşturacak şekilde birbirleri ile baz eşleşmesi yapabilir, burada baz eşleşmesi, sap1 ve sap2 arasında, örn. A ve U/T ya da G ve C nükleotitlerinin Watson-

Crick baz eşleşmesi yoluyla veya Watson-Crick harici baz eşleşmesi, örn. wobble baz eşleşmesi, geri Watson-Crick baz eşleşmesi, Hoogsteen baz eşleşmesi, geri Hoogsteen baz eşleşmesi yoluyla meydana gelebilir veya kısmen geri komplementer sekans oluşturacak şekilde birbirleri ile baz eşleşmesi yapabilir, burada bir saptaki bir veya daha fazla bazın, diğer sapın geri komplementer sekansında komplementer bir baza sahip olmaması bazında sap1 ile sap2 arasında eksik baz eşleşmesi meydana gelebilir.

10 Yukarıdaki bağlamda bir wobble baz eşleşmesi tipik olarak iki nükleotit arasında Watson-Crick harici bir baz eşleşmesidir. Mevcut bağlamda kullanılabilecek başlıca dört wobble baz çifti, guanosin-üridin, inosin-üridin, inosin-adenosin, inosin-sitidin (G-U/T, I-U/T, I-A ve I-C) ve adenosin-sitidin (A-C)'dir.

15

Buna göre mevcut buluş bağlamında bir wobble bazı, yukarıda tarif edildiği gibi başka bir baz ile bir wobble baz çifti oluşturan bir bazdır. Bu nedenle Watson-Crick harici baz eşleşmesi, örn. wobble baz eşleşmesi, mevcut buluşa göre histon sap-ilmığının sapında meydana gelebilir.

20

Yukarıdaki bağlamda bir kısmen geri komplementer sekans, sap1 ve sap2'nin baz eşleşmesi yoluyla oluşturulan sap-ilmik sekansının sap yapısında maksimum 2, tercihen sadece bir yanlış eşleşme içerir. Başka bir deyişle sap1 ve sap2 tercihen sap1 ve sap2'nin bütün sekansı boyunca birbirleri ile (tam) baz eşleşmesi yapabilir (olası doğru Watson-Crick veya Watson-Crick harici baz eşleşmelerin %100'ü), böylelikle bir geri komplementer sekans oluşturulur, burada her baz,

25

bir komplementer bağlanma ortağı olarak kendi doğru Watson-Crick veya Watson-Crick harici baz pendantına sahiptir. Alternatif olarak sap1 ve sap2 tercihen sap1 ve sap2'nin bütün sekansı boyunca birbirleri ile kısmi baz eşleşmesi yapabilir, burada 100% olası doğru Watson-Crick veya Watson-Crick harici baz eşleşmelerin en az yaklaşık %70, %75, %80, %85, %90 veya %95'i , doğru Watson-Crick veya Watson-Crick harici baz eşleşmeler ile işgal edilir ve en fazla yaklaşık %30, %25, %20, %15, %10 veya %5 geri kalan baz eşleşmez.

10

Buluşa ait birinci yönün tercih edilen bir düzeneğine göre burada tanımlandığı gibi, özellikle buluşa ait kitin veya parça kitinin nükleik asit sekanslarının en az bir histon sap-ilmği sekansı (sap sınırlama elemanları ile), yaklaşık 15 ila yaklaşık 45 nükleotitlik bir uzunluk, tercihen yaklaşık 15 ila yaklaşık 40 nükleotitlik bir uzunluk, tercihen yaklaşık 15 ila yaklaşık 35 nükleotitlik bir uzunluk, tercihen yaklaşık 15 ila yaklaşık 30 nükleotitlik bir uzunluk ve hatta daha fazla tercihen yaklaşık 20 ila yaklaşık 30 nükleotitlik bir uzunluk ve en fazla tercihen yaklaşık 24 ila yaklaşık 28 nükleotitlik bir uzunluk içerir.

20

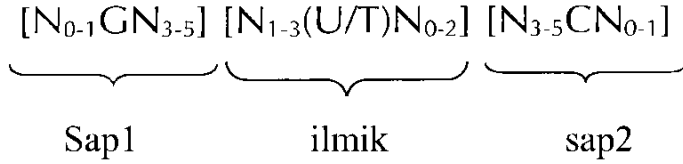
Buluşa ait birinci yönün tercih edilen başka bir düzeneğine göre burada tanımlandığı gibi, özellikle buluşa ait kitin veya parça kitinin nükleik asit sekanslarının en az bir histon sap-ilmği sekansı (sap sınırlama elemanları olmadan), yaklaşık 10 ila yaklaşık 30 nükleotitlik bir uzunluk, tercihen yaklaşık 10 ila yaklaşık 20 nükleotitlik bir uzunluk, tercihen yaklaşık 12 ila yaklaşık 20 nükleotitlik bir uzunluk, tercihen yaklaşık 14 ila yaklaşık 20 nükleotitlik bir uzunluk ve hatta

25

daha fazla tercihen yaklaşık 16 ila yaklaşık 17 nükleotitik bir uzunluk ve en fazla tercihen yaklaşık 16 nükleotitik bir uzunluk içerir.

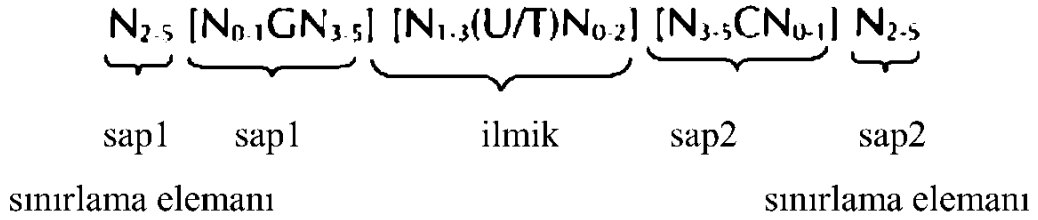
Buluşa ait birinci yönün başka bir tercih edilen düzeneğine göre, burada tanımlandığı gibi, özellikle mevcut buluşun birinci yönüne göre buluşa ait kitin veya parça kitinin nükleik asit sekansları, aşağıdaki spesifik formüller (Ia) veya (IIa)'dan en az birine göre en az bir histon sap-ilmği sekansı içerir veya bunun için kodlama yapar: formül (Ia) (sap sınırlama elemanları olmayan sap-ilmik sekansı):

10



formül (IIa) (sap sınırlama elemanları ile sap-ilmik sekansı):

15



20 burada:

N, C, G, T ve U

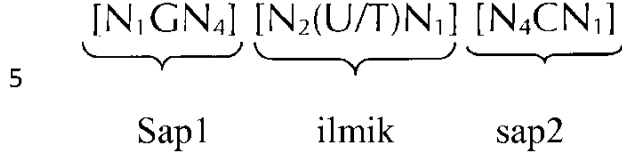
yukarıda tanımlandığı gibidir.

Birinci yönün daha fazla özellikle tercih edilen başka bir düzeneğine göre, burada tanımlandığı gibi, özellikle buluşa ait kitin veya parça kitinin nükleik asit sekansları, aşağıdaki spesifik formüller (Ib) veya

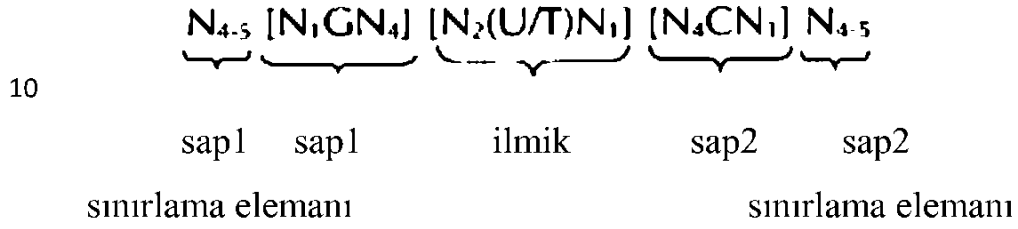
25

(IIb)'den en az birine göre en az bir histon sap-ilmîği sekansı içerebilir veya bunun için kodlama yapabilir:

formül (Ib) (sap sınırlama elemanları olmayan sap-ilmik sekansı):



formül (IIb) (sap sınırlama elemanları ile sap-ilmik sekansı):



burada:

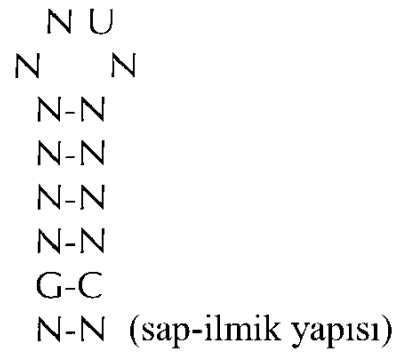
15 N, C, G, T ve U

yukarıda tanımlandığı gibidir.

Buluşa ait birinci yönün hatta daha fazla tercih edilen bir düzeneğine göre, burada tanımlandığı gibi, özellikle mevcut buluşun birinci yönüne göre buluşa ait kitin veya parça kitinin nükleik asit sekansları, sap-ilmik yapısında alternatif olarak gösterilen ve Örnek 1'e göre oluşturulan histon sap-ilmîği sekanslarını temsil eden bir lineer sekans olarak aşağıdaki spesifik formüller (Ic) ila (Ih) veya (IIc) ila (IIh)'den en az birine göre en az bir histon sap-ilmîği sekansı içerebilir veya

25 bunun için kodlama yapabilir:

formül (Ic): (sap sınırlama elemanları olmayan metazoan ve protozoan histon sap-ilmik konsensus sekansı):



NGNNNNNNUNNNNNNCN

5 (lineer sekans) (SEK.KİM.No: 1)

formül (IIc): (sap sınırlama elemanları ile metazoan ve protozoan histon sap-ilmik konsensus sekansı):

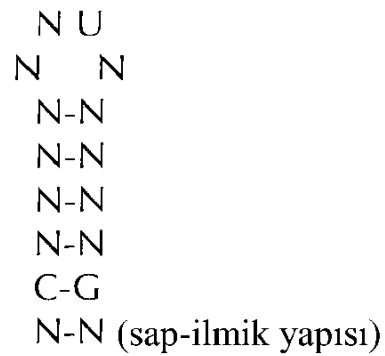


N*N*NNNN-NNNN*N*N* (sap-ilmik yapısı)

10 **N*N*NNNGNNNNNNUNNNNNNCNNNN*N*N***

(lineer sekans) (SEK.KİM.No: 2)

formül (Id): (sap sınırlama elemanları olmadan)



NCNNNNNNUNNNNNGN

(lineer sekans) (SEK.KİM.No: 3)

- 5 formül (IId): (sap sınırlama elemanları ile)

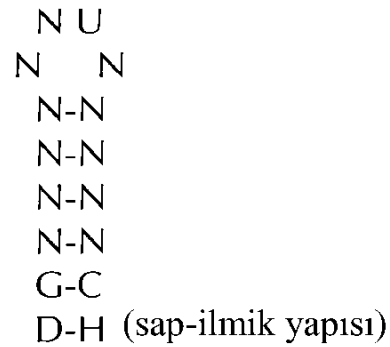


N*N*NNNN-NNNN*N*N* (sap-ilmik yapısı)

N*N*NNNNNCNNNNNNUNNNNNGNNNN*N*N*

(lineer sekans) (SEK.KİM.No: 4)

- 10 formül (Ie): (sap sınırlama elemanları olmayan protozoan histon sap-ilmik konsensus sekansı)



DGNNNNNNUNNNNNCH
(lineer sekans) (SEK.KİM.No: 6)

- 5 formül (Ile): (sap sınırlama elemanları ile protozoan histon sap-ilmik konsensus sekansı)



N*N*NNND-HNNN*N*N* (sap-ilmik yapısı)
N*N*NNNDGNNNNNNUNNNNNCHNNN*N*N*
(lineer sekans) (SEK.KİM.No: 6)

10

formül (If): (sap sınırlama elemanları olmayan metazoan histon sap-ilmik konsensus sekansı)

N U
 N N
 Y-V
 Y-N
 B-D
 N-N
 G-C
 N-N (sap-ilmik yapısı)

NGNBYYNNUNVNDNCN

(lineer sekans) (SEK.KİM.No: 7)

- formül (IIf): (sap sınırlama elemanları ile metazoan histon sap-ilmik konsensus sekansı)

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

N*N*NNNN-NNNN*N*N* (sap-ilmik yapısı)

N*N*NNNNGNBYYNNUNVNDNCNNNN*N*N*

(lineer sekans) (SEK.KİM.No: 8)

- 10 formül (Ig): (sap sınırlama elemanları olmayan omurgalı histon sap-ilmik konsensus sekansı)

N U
 D H
 Y-A
 Y-B
 Y-R
 H-D
 G-C
 N-N (sap-ilmik yapısı)

NGHYYYDNUHABRDCN

(lineer sekans) (SEK.KİM.No: 9)

- 5 formül (IIg): (sap sınırlama elemanları ile omurgalı histon sap-ilmik konsensus sekansı)

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

N*N*HNNN-NNNN*N*H* (sap-ilmik yapısı)

N*N*HNNNGHYYYDNUHABRDCNNNN*N*H*

(lineer sekans) (SEK.KİM.No: 10)

10

formül (Ih): (sap sınırlama elemanları olmayan insan histon sap-ilmik konsensus sekansı (Homo sapiens))

Y U
D H
U-A
C-S
Y-R
H-R
G-C
D-C (sap-ilmik yapısı)

DGHYCUDYUHASRRCC

(lineer sekans) (SEK.KİM.No: 11)

- 5 formül (IIh): (sap sınırlama elemanları ile insan histon sap-ilmik konsensus sekansı (Homo sapiens))

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

N*H*AAHD-CVHB*N*H* (sap-ilmik yapısı)

N*H*AAHDGHYCUDYUHASRRCCVHB*N*H*

(lineer sekans) (SEK.KİM.No: 12)

10

burada yukarıdaki formüller (Ic) ila (Ih) veya (IIc) ila (IIh)'nin her birinde:

N, C, G, A, T ve U yukarıda tanımlandığı gibidir;

her U, T ile değiştirilebilir;

- 15 sap elemanları 1 ve 2'deki her (yüksek oranda) konserve edilmiş G veya C, bunun komplementer nükleotit bazı C veya G ile

değiştirilebilir, ancak karşılık gelen sapta bunun komplementer nükleotidinin, bunun komplementer nükleotidi ile paralel şekilde değiştirilmesi gerekir; ve/veya

G, A, T, U, C, R, Y, M, K, S, W, H, B, V, D ve N, aşağıdaki Tabloda

5 tanımlanan nükleotit bazlarıdır:

kısaltma	Nükleotit bazları	açıklama
G	G	Guanin
A	A	Adenin
T	T	Timin
U	U	Urasil
C	C	Sitosin
R	G veya A	Purin
Y	T/U veya C	Pirimidin
M	A veya C	Amino
K	G veya T/U	Keto
S	G veya C	Güçlü (3H bağları)
W	A veya T/U	Zayıf (2H bağları)
H	A veya C veya T/U	G Değil
B	G veya T/U veya C	A Değil
V	G veya C veya A	T/U Değil
D	G veya A veya T/U	C Değil
Hayır	G veya C veya T/U veya A	Herhangi bir baz
*	Var veya yok	Baz var olabilir veya olmayabilir

Bu bağlamda mevcut buluşun formülleri (I) veya (Ia) ile (Ih) veya (II) veya (IIa) ile (IIh)'den en az birine uygun histon sap-ilmîği sekansının, doğal yoldan meydana gelen bir histon sap-ilmîği sekansından, daha fazla özellikle tercihen protozoan veya metazoan histon sap-ilmîği sekanslarından ve hatta daha fazla özellikle tercihen omurgalı ve en fazla tercihen memeli histon sap-ilmîği sekanslarından, özellikle insan histon sap-ilmîği sekanslarından seçilmesi özellikle tercih edilir.

15

Birinci yönün özellikle tercih edilen bir düzeneğine göre mevcut buluşun spesifik formülleri (I) veya (Ia) ile (Ih) veya (II) veya (IIa) ile

(Ih)'den en az birine uygun histon sap-ilmği sekansı, her nükleotit pozisyonunda, en sık şekilde meydana gelen nükleotidi veya şekil 1-5'te gösterildiği gibi metazoa ve protozoa (Şekil 1), protozoa (Şekil 2), metazoa (Şekil 3), omurgalılar (Şekil 4) ve insanlarda (Şekil 5) doğal yoldan meydana gelen histon sap-ilmği sekanslarının ya en sık şekilde ya da ikinci en sık şekilde meydana gelen nükleotidini içeren bir histon sap-ilmği sekansıdır. Bu bağlamda tüm nükleotitlerin en az %80'inin, tercihen en az %85'inin veya en fazla tercihen en az %90'ının, doğal yoldan meydana gelen histon sap-ilmği sekanslarının en sık şekilde meydana gelen nükleotidine karşılık gelmesi özellikle tercih edilir. Birinci yönün başka bir özel düzeneğinde mevcut buluşa ait spesifik formüller (I) veya (Ia) ıla (Ih)'den en az birine göre histon sap-ilmği sekansı, Örnek 1'e göre oluşturulan histon sap-ilmği sekanslarını temsil eden aşağıdaki histon sap-ilmği sekansları (sap sınırlama elemanları olmadan) arasından seçilir:

VGYYYYHHTHRVVRCB (formül (Ic)'ye göre SEK.KİM.NO: 13)
 SGYYTTYTMARRRCS (formül (Ic)'ye göre SEK.KİM.NO: 14)
 SGYYCTTTTMAGRRCs (formül (Ic)'ye göre SEK.KİM.NO: 15)
 DGNNBNNTHVNNCH (formül (Ie)'ye göre SEK.KİM.NO: 16)
 RGNNNYHBTHRDNNCY (formül (Ie)'ye göre SEK.KİM.NO: 17)
 RGNDBYHYTHRDHNCY (formül (Ie)'ye göre SEK.KİM.NO: 18)
 VGYYTYHTRVRCB (formül (If)'ye göre SEK.KİM.NO: 19)
 SGYYCTTYTMAGRRCs (formül (If)'ye göre SEK.KİM.NO: 20)
 SGYYCTTTTMAGRRCs (formül (If)'ye göre SEK.KİM.NO: 21)
 GGYCTTYTHAGRCC (formül (Ig)'ye göre SEK.KİM.NO: 22)
 GGCYCTTYTMAGRCC (formül (Ig)'ye göre SEK.KİM.NO: 23)
 GGCTCTTTTMAGRCC (formül (Ig)'ye göre SEK.KİM.NO: 24)
 DGHYCTDYTHASRRCC (formül (Ih)'ye göre SEK.KİM.NO: 25)

GGCYCTTTTHAGRGCC (formül (Ih)'ye göre SEK.KİM.NO: 26)

GGCYCTTTTMAGRGCC (formül (Ih)'ye göre SEK.KİM.NO: 27)

- Ek olarak bu bağlamda spesifik formüller (II) veya (IIa) ila (IIh)'den
5 birine göre Örnek 1'e göre oluşturulan aşağıdaki histon sap-ilmği
sekansları (sap sınırlama elemanları ile) özellikle tercih edilir:

H*H*HHVVGYYYYHHTHRVVRCBVHH*N*N* (formül (IIc)'ye
göre SEK.KİM.NO: 28)

- M*H*MHMSGYYTTTYTMARRRCSMCH*H*H* (formül (IIc)'ye
10 göre SEK.KİM.NO: 29)

M*M*MMMSGYYCTTTTMAGRRCsACH*M*H* (formül (IIc)'ye
göre SEK.KİM.NO: 30)

N*N*NNNDGNNBNNTHVNNNCHNH*N*N* (formül (IIe)'ye
göre SEK.KİM.NO: 31)

- N*N*HHNRGNNNYHBTHRDNNCYDHH*N*N* (formül (IIe)'ye
15 göre SEK.KİM.NO: 32)

N*H*HHVRGNDBYHYTHRDHNCYRHH*H*H* (formül (IIe)'ye
göre SEK.KİM.NO: 33)

- H*H*MHMVGYYTYHTHRVRRCBVMH*H*N* (formül (IIf)'ye
20 göre SEK.KİM.NO: 34)

M*M*MMMSGYYCTTYTMAGRRCsMCH*H*H* (formül (IIf)'ye
göre SEK.KİM.NO: 35)

M*M*MMMSGYYCTTTTMAGRRCsACH*M*H* (formül (IIf)'ye
göre SEK.KİM.NO: 36)

- H*H*MAMGGYYCTTYTHAGRRCVHN*N*M* (formül (IIg)'ye
25 göre SEK.KİM.NO: 37)

H*H*AAMGGCYCTTYTMAGRGCcVCH*H*M* (formül (IIg)'ye
göre SEK.KİM.NO: 38)

M*M*AAMGGCTCTTTTMAGRGCCMCY*M*M* (formül (IIg)'ye göre SEK.KİM.NO: 39)

N*H*AAHDGHYCTDYTHASRRCCVHB*N*H* (formül (IIh)'ye göre SEK.KİM.NO: 40)

5 H*H*AAMGGCYCTTTTHAGRGCCVMY*N*M* (formül (IIh)'ye göre SEK.KİM.NO: 41)

H*M*AAAGGCYCTTTTMAGRGCCRMV*H*M* (formül (IIh)'ye göre SEK.KİM.NO: 42)

- 10 Buluşa ait birinci yönün başka bir tercih edilen düzeneğine göre, burada tanımlandığı gibi, özellikle buluşa ait kitin veya parça kitinin nükleik asit sekansları, spesifik formüller (I) veya (Ia) ile (Ih) veya (II) veya (IIa) ile (IIh)'den en az birine göre histon sap-ilmliği sekanslarında %100'e kadar konserve edilmiş olmayan nükleotitler ile
- 15 veya doğal yoldan meydana gelen bir histon sap-ilmliği sekansı ile en az yaklaşık %80, tercihen en az yaklaşık %85, daha fazla tercihen en az yaklaşık %90 veya hatta daha fazla tercihen en az yaklaşık %95 sekans özdeşliği gösteren en az bir histon sap-ilmliği sekansını içerir veya bunun için kodlama yapar.

20

- Tercih edilen bir düzende histon sap ilmliği sekansı, 5'-UUUC-3' ilmik sekansını ihtiva etmez. Daha spesifik olarak histon sap ilmliği, ayrı ayrı 5'-GGCUCU-3' sap1 sekansını ve/veya 5'-AGAGCC-3' sap2 sekansını ihtiva etmez. Tercih edilen başka bir düzende histon sap
- 25 ilmliği sekansı, 5'-CCUGCCC-3' ilmik sekansını veya 5'-UGAAU-3' ilmik sekansını ihtiva etmez. Daha spesifik olarak sap ilmik, 5'-CCUGAGC-3' sap1 sekansını ihtiva etmez veya ayrı ayrı 5'-ACCUUUCUCCA-3' sap1 sekansını ve/veya 5'-GCUCAGG-3' veya

5'-UGGAGAAAGGU-3' sap2 sekansını ihtiva etmez. Ayrıca buluş, spesifik olarak histon sap ilmiği sekansları ile sınırlı olmadığı sürece sap ilmik sekansları tercihen bir memeli insulin reseptörü 3' translasyon yapılmamış bölgeden türetilmez. Ayrıca tercihen burada tanımlandığı gibi, özellikle buluşa ait kitin veya parça kitinin nükleik asitleri, histon sap ilmiği işleme sinyalleri, özellikle fare histon geni H2A614 geninden (H2kA614) türetilenleri ihtiva etmeyebilir.

Mevcut buluşun birinci yönüne göre, burada tanımlandığı gibi, özellikle buluşa ait kitin veya parça kitinin nükleik asit sekansları, bir poli(A) sekansı içerir veya bunun için kodlama yapar. Böyle bir poli(A) sekansı, yaklaşık 25 ile yaklaşık 400 adenosin nükleotitlik bir sekans, tercihen yaklaşık 30 veya daha fazla tercihen yaklaşık 50 ile yaklaşık 400 adenosin nükleotitlik bir sekans, daha fazla tercihen yaklaşık 50 ile yaklaşık 300 adenosin nükleotitlik bir sekans, hatta daha fazla tercihen yaklaşık 50 ile yaklaşık 250 adenosin nükleotitlik bir sekans, en fazla tercihen yaklaşık 60 ile yaklaşık 250 adenosin nükleotitlik bir sekans içerir. Bu bağlamda "yaklaşık" terimi, bağlı olduğu değer(ler)in $\pm \%10$ 'u kadar bir sapmaya karşılık gelir. Buna göre poli(A) sekansı, en az 25 veya 25'ten fazla, daha fazla tercihen en az 30, daha fazla tercihen en az 50 adenosin nükleotidi ihtiva eder. Böylelikle böyle bir poli(A) sekansı tipik olarak 20'den az adenosin nükleotidi ihtiva etmez. Daha belirgin olarak bu, 10 ve/veya 10'dan az adenosin nükleotidi ihtiva etmez.

25

Tercihen burada tanımlandığı gibi, özellikle buluşa ait kitin veya parça kitinin nükleik asitleri, şunlardan oluşan grubun bileşenlerinden birini veya ikisini ya da en az birini veya biri hariç tamamını ya da tamamını

ihtiva etmez: bir ribozimi (tercihen kendi kendine uç uca eklenen bir
 ribozimi) şifreleyen bir sekans, bir viral nükleik asit sekansı, bir histon
 sap-ilmîği işleme sinyali, özellikle fare histon H2A614 geninden
 türetilmiş bir histon sap-ilmîği işleme sinyali, bir Neo geni,
 5 eylemsizleştirilmiş bir promoter sekansı ve eylemsizleştirilmiş bir
 güçlendirici sekansı. Hatta daha fazla tercihen burada tanımlandığı
 gibi, özellikle buluşa ait kitin veya parça kitinin nükleik asitleri, bir
 ribozim, tercihen kendi kendine uç uca eklenen bir ribozim ve
 şunlardan oluşan gruptan birini ihtiva etmez: bir Neo geni,
 10 eylemsizleştirilmiş bir promoter sekansı, eylemsizleştirilmiş bir
 güçlendirici sekansı, bir histon sap-ilmîği işleme sinyali, özellikle fare
 histon H2A614 geninden türetilmiş bir histon sap-ilmîği işleme
 sekansı. Buna göre burada tanımlandığı gibi, özellikle buluşa ait kitin
 veya parça kitinin nükleik asitleri, tercih edilen bir modda, bir
 15 ribozim, tercihen kendi kendine uç uca eklenen bir ribozim veya bir
 Neo geni, ya da alternatif olarak bir ribozim, tercihen uç uca eklenen
 bir ribozim veya bir direnç geni (örn. genellikle seçim için uygulanır)
 ihtiva etmeyebilir. Tercih edilen başka bir modda, burada tanımlandığı
 gibi, özellikle buluşa ait kitin veya parça kitinin nükleik asitleri, bir
 20 ribozim, tercihen kendi kendine uç uca eklenen bir ribozim veya bir
 histon sap-ilmîği işleme sinyali, özellikle fare histon H2A614
 geninden türetilmiş bir histon sap-ilmîği işleme sekansı ihtiva
 etmeyebilir.

25 (Transkripte edilmiş) bir mRNA'ya spesifik protein faktörleri (örn.
 klivaj ve poliadenilasyon spesifiklik faktörü (CPSF), klivaj uyarma
 faktörü (CstF), klivaj faktörleri I ve II (CF I ve CF II), poli(A)
 polimeraz (PAP)) yoluyla poliadenilasyon veren sinyaller olarak

burada tanımlanan poliadenilasyon sinyalleri de teknikte bilinir. Bu bağlamda konsensus poliadenilasyon sinyalleri, NN(U/T)ANA konsensus sekansını içerebilir. Spesifik olarak poliadenilasyon sinyalleri, şu sekanslardan birini içerebilir: AA(U/T)AAA veya

5 A(U/T)(U/T)AAA (burada üridin genellikle RNA içinde bulunur ve timidin genellikle DNA içinde bulunur). Bazı durumlarda nükleik asitlerde kullanılan poliadenilasyon sinyalleri, U3 snRNA'ya, U5'e, insan geni G-CSF'den poliadenilasyon işleme sinyaline veya SV40 poliadenilasyon sinyal sekanslarına karşılık gelmez. Özellikle

10 yukarıdaki poliadenilasyon sinyalleri bazı durumlarda bir antibiyotik direnç geni (veya başka bir raportör, marker veya seçim geni), özellikle direnç neo geni (neomisin fosfotransferaz) ile birleştirilemez. Yukarıdaki poliadenilasyon sinyallerinden biri bazı durumlarda histon sap ilmiği veya fare histon geni H2A614'ten histon sap ilmiği işleme

15 sinyali ile birleştirilemez.

İstemlerde tanımlandığı gibi, mevcut buluşun birinci yönüne uygun kit veya parça kiti, NY-ESO-1, 5T4, surviving, MAGE-C1 ve MAGE-C2'yi veya bunların bir fragmanını şifreleyen nükleik asitler içerir.

20 Ayrıca burada bir tümör antijeni veya bunun bir fragmanını, varyantını veya türevini içeren bir proteini veya bir peptidi şifreleyebilen nükleik asit sekansları açıklanır.

Tümör antijenleri tercihen bir memeli, özellikle insan tümörünü (örn.

25 sistemik veya katı tümör hastalıklarında) karakterize eden (tümör) hücrenin yüzeyi üzerinde bulunur. Tümör antijenleri ayrıca normal bir hücreye kıyasla tümör hücrelerinde aşırı eksprese edilen proteinler arasından seçilebilir. Ek olarak tümör antijenleri ayrıca kendileri (veya

başlangıçta kendileri) dejenere olmayan (olmamış olan), ancak tahmin edilen tümörle bağlantılı olan hücreler içinde eksprese edilen antijenler içerir. Tümöre besleme yapan damarlar veya bunların (yeniden) oluşması ile bağlantılı antijenler, özellikle neovaskülarizasyon ile bağlantılı antijenler, örn. büyüme faktörleri, 5 örneğin VEGF, bFGF vb. de buraya dahildir. Bir tümör ile bağlantılı antijenler ayrıca tipik olarak tümörü oluşturan hücrelerden veya dokulardan gelen antijenler içerir. Ayrıca bazı maddeler (genellikle proteinler veya peptitler), bir kanser hastalığından (bilerek veya 10 bilmeden) muzdarip olan hastalarda eksprese edilir ve bunlar, adı geçen hastaların vücut sıvılarında artan konsantrasyonlarda meydana gelir. Bu maddeler ayrıca "tümör antijenleri" olarak adlandırılır, bununla birlikte bunlar, bir immün tepkisine neden olan bir madde şeklindeki katı anlamda antijenler değildir. Tümör antijenleri sınıfı 15 ayrıca tümöre spesifik antijenler (TSA'lar) ve tümörle bağlantılı antijenler (TAA'lar) olarak ayrılabilir. TSA'lar sadece tümör hücreleri tarafından sunulabilir ve asla normal "sağlıklı" hücreler tarafından sunulmaz. Bunlar tipik olarak tümöre spesifik bir mutasyondan kaynaklanır. Daha yaygın olan TAA'lar genellikle hem tümör 20 hücreleri hem sağlıklı hücreler tarafından sunulur. Bu antijenler fark edilir ve antijen sunan hücre, sitotoksik T hücreleri tarafından imha edilebilir. Ek olarak tümör antijenleri ayrıca tümörün yüzeyi üzerinde örn. mutasyona uğramış bir reseptör formunda meydana gelebilir. Bu durumda bunlar, antikorlar tarafından fark edilir.

25

Ek olarak tümörle bağlantılı antijenler, ayrıca melanosite spesifik antijenler olarak adlandırılan dokuya spesifik antijenler, kanser-testis antijenleri ve tümöre spesifik antijenler olarak sınıflandırılabilir.

Kanser-testis antijenleri tipik olarak çok çeşitli tümörlerde aktifleştirilebilen, germ çizgisi ile bağlantılı genlerin peptitleri veya proteinleri şeklinde anlaşılır. İnsan kanser-testis antijenleri ayrıca X kromozomu üzerinde şifrelenen ve CT-X antijenleri olarak

5 adlandırılan antijenler ve X kromozomu üzerinde şifrelenmeyen ve (X harici CT antijenleri) olarak adlandırılan antijenler halinde tekrar ayrılabilir. X kromozomu üzerinde şifrelenen kanser-testis antijenleri örneğin melanoma antijen genleri familyasını, bilinen adıyla MAGE familyasını içerir. MAGE familyası genleri, paylaşılan bir MAGE

10 homoloji alanı (MHD) ile karakterize edilebilir. Bu antijenlerin her biri, yani melanosite spesifik antijenler, kanser-testis antijenleri ve tümöre spesifik antijenler, otolog hücrel ve humoral immün tepkisi uyandırabilir. Buna göre burada tanımlandığı gibi, özellikle buluşa ait kitin veya parça kitinin nükleik asit sekansları tarafından şifrelenen

15 tümör antijeni tercihen melanosite spesifik bir antijen, bir kanser-testis antijeni veya tümöre spesifik antijenlerdir, tercihen bu, bir CT-X antijeni, X harici CT antijenleri, bir CT-X antijeni için bir bağlanma ortağı veya X harici CT antijeni için bir bağlanma ortağı veya tümöre spesifik bir antijen, daha fazla tercihen bir CT-X antijeni, X harici CT

20 antijeni için bir bağlanma ortağı veya tümöre spesifik bir antijen olabilir.

Belirli tercih edilen tümör antijenleri, 5T4, 707-AP, 9D7, AFP, AlbZIP HPG1, alfa-5-beta-1-integrin, alfa-5-beta-6-integrin, alfa-

25 aktinin-4/m, alfa-metilasil-koenzim A rasemaz, ART-4, ARTC1/m, B7H4, BAGE-1, BCL-2, bcr/abl, beta-katenin/m, BING-4, BRCA1/m, BRCA2/m, CA 15-3/CA 27-29, CA 19-9, CA72-4, CA125, kalretikulin, CAMEL, CASP-8/m, katepsin B, katepsin 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, koaktosin benzeri protein, kolaj XXIII, COX-2,
 CT-9/BRD6, Cten, siklin B1, siklin D1, cyp-B, CYPB1, DAM-10,
 5 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, hepsin, Her2/neu, HERV-K-MEL,
 10 HLA-A*0201-R17I, HLA-A11/m, HLA-A2/m, HNE, homeobox
 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,
 olgun olmayan laminin reseptörü, kallikrein-2, kallikrein-4, Ki67,
 KIAA0205, KIAA0205/m, KK-LC-1, K-Ras/m, LAGE-A1, LDLR-
 15 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-
 20 F1, MAGE-H1, MAGEL2, mammaglobin A, MART-1/melan-A,
 MART-2, MART-2/m, matris proteini 22, MC1R, M-CSF, ME1/m,
 mezotelin, MG50/PXDN, MMP11, MN/CA IX antijeni, MRP-3,
 MUC-1, MUC-2, MUM-1/m, MUM-2/m, MUM-3/m, miyosin sınıfı
 I/m, NA88-A, N-asetilglukozaminiltransferaz-V, Neo-PAP, Neo-
 25 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,
 osteokalsin, osteopontin, p15, p190 minör bcr-abl, p53, p53/m,
 PAGE-4, PAI-1, PAI-2, PAP, PART-1, PATE, PDEF, Pim-1-Kinaz,

Pin-1, Pml/PARalpha, POTE, PRAME, PRDX5/m, prostein, proteinaz-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, survivin, survivin-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, tirosinaz, UPA, VEGFR1, VEGFR-2/FLK-1 ve WT1'den oluşan gruptan seçilir. Bu tümör antijenleri tercihen p53, CA125, EGFR, Her2/neu, hTERT, PAP, MAGE-A1, MAGE-A3, Mezetelin, MUC-1, GP100, MART-1, Tirosinaz, PSA, PSCA, PSMA, STEAP-1, VEGF, VEGFR1, VEGFR2, Ras, CEA veya WT1'den oluşan gruptan ve daha fazla tercihen PAP, MAGE-A3, WT1 ve MUC-1 arasından seçilebilir. Bu tümör antijenleri tercihen MAGE-A1 (örn. M77481 erişim numarasına göre MAGE-A1), MAGE-A2, MAGE-A3, MAGE-A6 (örn. NM_005363 erişim numarasına göre MAGE-A6), MAGE-C1, MAGE-C2, melan-A (örn. NM_005511 erişim numarasına göre melan-A), GP100 (örn. M77348 erişim numarasına göre GP100), tirosinaz (örn. NM_000372 erişim numarasına göre tirosinaz), survivin (örn. AF077350 erişim numarasına göre survivin), CEA (örn. NM_004363 erişim numarasına göre CEA), Her-2/neu (örn. M11730 erişim numarasına göre Her-2/neu), WT1 (örn. NM_000378 erişim numarasına göre WT1), PRAME (örn. NM_006115 erişim numarasına göre PRAME), EGFR1 (epidermal büyüme faktöre reseptörü 1) (örn. AF288738 erişim numarasına göre EGFR1 (epidermal büyüme faktörü reseptörü 1)), MUC1, musin-1 (örn. NM_002456 erişim numarasına göre musin-1), SEC61G (örn. NM_014302 erişim numarasına göre SEC61G),

hTERT (örn. NM_198253 erişim numarasına göre hTERT), 5T4 (örn. NM_006670 erişim numarasına göre 5T4), TRP-2 (örn. NM_001922 erişim numarasına göre TRP-2), STEAP1, PCA, PSA, PSMA, vb.'den oluşan gruptan seçilebilir.

5

Ek olarak tümör antijenleri ayrıca bir kanser veya tümör hastalığı, özellikle lenfoma veya lenfoma ile bağlantılı bir hastalık ile bağlantılı idiyotipik antijenler içerebilir, burada adı geçen idiyotipik antijen, bir lenfoid kan hücresinin bir immünoglobulin idiyotipi veya bir lenfoid kan hücresinin bir T hücresi reseptörü idiyotipidir.

Kanserin veya tümör hastalıklarının tedavisine yönelik tümör antijenik proteinleri tipik olarak memeli kaynaklı, tercihen insan kaynaklı proteinlerdir. Bunların, süjenin tedavisi için seçilmesi, tedavi edilecek tümörün tipine ve ilgili tümörün ekspresyon profiline bağlıdır. Prostat kanserinden muzdarip bir insan örn. tercihen tipik olarak prostat karsinomada eksprese edilen (veya aşırı eksprese edilen) ya da spesifik olarak tedavi edilecek süjede aşırı eksprese edilen bir tümör antijeni, örn. PSMA, PSCA ve/veya PSA'dan herhangi biri ile tedavi edilir. Burada tanımlandığı gibi, özellikle mevcut buluşun birinci yönüne göre buluşa ait kitin veya parça kitinin nükleik asitlerinin kodlama bölgesi, bir mono-, di- veya hatta multi-cistronik nükleik asit olarak, yani bir, iki veya daha fazla proteinin veya peptidin kodlama sekanslarını taşıyan bir nükleik asit olarak meydana gelebilir. Di- veya hatta multi-cistronik nükleik asitlerdeki bu kodlama sekansları, örn. burada tarif edildiği gibi en az bir dahili ribozom giriş sahası (IRES) sekansı ile veya birçok protein veya peptit içeren ortaya çıkan polipeptidin klivajını indükleyen sinyal peptitleri ile ayrılabilir.

Mevcut açıklamaya göre burada tanımlandığı gibi, özellikle buluşa ait kitin veya parça kitinin nükleik asit sekansları, bir tümör antijeni veya bunun bir fragmanını, varyantını veya türevini içeren bir peptidi veya proteini şifreleyen bir kodlama bölgesi içerir. Tercihen şifrelenen tümör antijeni, histon olmayan bir proteindir. Mevcut buluş bağlamında böyle bir histon proteini tipik olarak ökaryotik hücre çekirdeğinde bulunan ve DNA'yı nükleozomlar olarak adlandırılan yapısal birimler halinde paketleyen ve sıralayan, güçlü şekilde alkalik bir proteindir. Histone proteinleri, kromatinin başlıca protein bileşenleridir, etrafına DNA'nın sarıldığı makara görevi görür ve gen regülasyonunda rol oynar. Histonlar olmadan kromozomlar içinde sarılmamış DNA, çok uzun olacaktır (insan DNA'sında uzunluğun genişliğe oranı, bire 10 milyonun üzerindedir). Örneğin her insan hücresi, yaklaşık 1.8 metre DNA'ya sahiptir, ancak histonlar üzerine sarıldığında bu yaklaşık 90 milimetre kromatine sahiptir, bu ise mitoz sırasında çoğaldığında ve yoğunlaştığında, yaklaşık 120 mikrometre kromozom ile sonuçlanır. Daha fazla tercihen mevcut buluş bağlamında böyle bir histon proteini tipik olarak şu başlıca beş histon sınıfından birinden seçilen, yüksek oranda konserve edilmiş bir protein olarak tanımlanır: H1/H5, H2A, H2B, H3 ve H4"; tercihen memeli histon, daha fazla tercihen insan histonları veya histon proteinleri arasından seçilir. Bu histonlar veya histon proteinleri tipik olarak H2A, H2B, H3 ve H4 histonlarını içeren göbek histonlar ve H1 ve H5 histonlarını içeren bağlayıcı histonlar şeklinde tanımlanan iki süper sınıf halinde organize edilir.

Bu bağlamda bağlayıcı histonlar tercihen beklemedeki buluşun koruma kapsamından çıkarılmış olup, tercihen memeli bağlayıcı

histonları, daha fazla tercihen insan bağlayıcı histonlardır ve tipik olarak H1F dahil, özellikle H1F0, H1FNT, H1FOO, H1FX ve H1H1 dahil, özellikle HIST1H1A, HIST1H1B, HIST1H1C, HIST1H1D, HIST1H1E ve HIST1H1T dahil olmak üzere H1 arasından seçilir.

5

Ek olarak göbek histonları, tercihen beklemedeki buluşun koruma kapsamından çıkarılmış olup, tercihen memeli göbek histonları, daha fazla tercihen insan göbek histonlarıdır ve tipik olarak H2AF dahil, özellikle H2AFB1, H2AFB2, H2AFB3, H2AFJ, H2AFV, H2AFX, H2AFY, H2AFY2, H2AFZ ve H2A1 dahil, özellikle HIST1H2AA, HIST1H2AB, HIST1H2AC, HIST1H2AD, HIST1H2AE, HIST1H2AG, HIST1H2AI, HIST1H2AJ, HIST1H2AK, HIST1H2AL, HIST1H2AM ve H2A2 dahil, özellikle HIST2H2AA3, HIST2H2AC dahil olmak üzere H2A; H2BF dahil, özellikle H2BFM, H2BFO, H2BFS, H2BFWT H2B1 dahil, özellikle HIST1H2BA, HIST1H2BB, HIST1H2BC, HIST1H2BD, HIST1H2BE, HIST1H2BF, HIST1H2BG, HIST1H2BH, HIST1H2BI, HIST1H2BJ, HIST1H2BK, HIST1H2BL, HIST1H2BM, HIST1H2BN, HIST1H2BO, ve H2B2 dahil, özellikle HIST2H2BE dahil olmak üzere H2B; H3A1 dahil, özellikle HIST1H3A, HIST1H3B, HIST1H3C, HIST1H3D, HIST1H3E, HIST1H3F, HIST1H3G, HIST1H3H, HIST1H3I, HIST1H3J ve H3A2 dahil, özellikle HIST2H3C ve H3A3 dahil, özellikle HIST3H3 dahil olmak üzere H3; H41 dahil, özellikle HIST1H4A, HIST1H4B, HIST1H4C, HIST1H4D, HIST1H4E, HIST1H4F, HIST1H4G, HIST1H4H, HIST1H4I, HIST1H4J, HIST1H4K, HIST1H4L ve H44 dahil, özellikle HIST4H4 dahil olmak üzere H4 ve H5 arasından seçilir.

25

- Mevcut açıklamaya göre burada tanımlandığı gibi, özellikle buluşa ait kitin veya parça kitinin nükleik asit sekansları, bir tümör antijeni veya bunun bir fragmanını, varyantını veya türevini içeren bir peptidi veya proteini şifreleyen bir kodlama bölgesi içerir. Tercihen şifrelenmiş tümör antijeni, raportör protein (örn. Lusiferaz, Yeşil Flüoresan Proteini (GFP), Güçlendirilmiş Yeşim Flüoresan Proteini (EGFP), β -Galaktosidaz) değildir ve marker veya seçim proteini (örn. alfa-Globin, Galaktokinaz ve Ksantin:guanin fosforibosil transferaz (GPT)) değildir. Tercihen burada tanımlandığı gibi, özellikle buluşa ait kitin veya parça kitinin nükleik asit sekansları, bir (bakteriyel) antibiyotik direnç geni, özellikle bir neo geni sekansı (Neomisin direnç geni) veya CAT geni sekansı (kloramfenikol asetil transferaz, kloramfenikol direnç geni) ihtiva etmez.
- Yukarıda tanımlandığı gibi, özellikle buluşa ait kitin veya parça kitinin nükleik asitleri, diğerlerinin yanı sıra, a) bir tümör antijeni veya bunun bir fragmanını, varyantını veya türevini içeren bir peptidi veya proteini şifreleyen bir kodlama bölgesi; b) en az bir histon sap-ilmği, ve c) tercihen adı geçen şfrenmiş peptidin veya proteinin ekspresyonunu arttırmak için bir poli(A) sekansı içerir veya bunlar için kodlama yapar; burada şifrelenmiş peptit veya protein tercihen yukarıda tanımlandığı gibi histon proteini değildir, raportör protein değildir ve/veya marker veya seçim proteini değildir. Adı geçen nükleik asitlerin b) ile c) elemanları, nükleik asitler içinde herhangi bir sırada meydana gelebilir, yani a), b) ve c) elemanları, nükleik asit sekansında 5' 'ten 3' 'e doğrultuda a), b) ve c) sırasıyla meydana gelebilir, burada nükleik asit ayrıca en az 10 sitiklin nükleotidi içeren bir poli(C) sekansı içerir veya bunun için kodlama yapar. Bir 5'-CAP

- yapısı, stabilizasyon sekansları, IRES sekansları, vb. gibi burada tarif edilen başka elemanlar da bulunabilir. Burada tanımlandığı gibi, özellikle buluşa ait kitin veya parça kitinin nükleik asitlerinin a)'dan c)'ye kadar olan elemanlarının her biri, özellikle di- veya multicistronik yapılarda a) ve/veya b) ve c) elemanlarının her biri, daha fazla tercihen b) elemanı da en az bir kez, tercihen iki veya daha fazla kez adı geçen nükleik asitlerde tekrar edilebilir. Örnek olarak burada tarif edilen nükleik asitler, a), b) ve isteğe bağlı olarak c) sekans elemanlarını, örn. aşağıdaki sırada içerebilir:
- 5' - kodlama bölgesi - histon sap-ilmiği - poli(A) sekansı - 3'; veya
 5' - kodlama bölgesi - histon sap-ilmiği - poliadenilasyon sinyali - 3';
 veya
 5' - kodlama bölgesi - poli(A) sekansı - histon sap-ilmiği - 3'; veya
 5' - kodlama bölgesi - poliadenilasyon sinyali - histon sap-ilmiği - 3';
 veya
 5' - kodlama bölgesi - kodlama bölgesi - histon sap-ilmiği - poliadenilasyon sinyali - 3'; veya
 5' - kodlama bölgesi - histon sap-ilmiği - histon sap-ilmiği - poli(A) sekansı - 3'; veya
 5' - kodlama bölgesi - histon sap-ilmiği - histon sap-ilmiği - poliadenilasyon sinyali - 3'; vb.

Bu bağlamda burada tanımlandığı gibi, özellikle buluşa ait kitin veya parça kitinin nükleik asit sekanslarının, diğerlerinin yanı sıra, a) bir tümör antijeni veya bunun fragmanını, varyantını veya türevini içeren bir peptidi veya proteini şifreleyen bir kodlama bölgesi; b) burada tanımlandığı gibi en az bir histon sap-ilmiği, ve c) tercihen adı geçen şifrelenmiş peptidin veya proteinin ekspresyon düzeyini arttırmak için

bir poli(A) sekansı içermesi özellikle tercih edilir, buradaki şifrelenmiş protein tercihen histon proteini, raporör protein (örn. Lusiferaz, GFP, EGFP, β -Galaktosidaz, özellikle EGFP) ve/veya marker veya seçim proteini (örn. alfa-Globin, Galaktokinaz ve Ksantin:Guanin fosforibosil transferaz (GPT)) değildir.

Birinci yönün başka bir tercih edilen düzeneğinde burada tanımlandığı gibi, özellikle buluşa ait kitin veya parça kitinin nükleik asit sekansları ayrıca modifiye edilmiş nükleik asitler formunda meydana gelebilir.

10

Bu bağlamda burada tanımlandığı gibi, özellikle buluşa ait kitin veya parça kitinin nükleik asit sekansları, bir "stabilize nükleik asit", tercihen bir stabilize RNA, daha fazla tercihen in vivo degradasyona (örn. bir ekso- veya endo-nükleaz tarafından) esasen dirençli bir RNA sağlayacak şekilde modifiye edilebilir. Bir stabilize nükleik asit, örn. buluşa ait nükleik asit sekansının kodlama bölgesinin G/C içeriğinin modifikasyonu yoluyla, nükleotit analoglarının (örn. omurga modifikasyonlarına, şeker modifikasyonlarına veya baz modifikasyonlarına sahip nükleotitlerin) sokulması yoluyla veya buluşa ait nükleik asit sekansının 3'- ve/veya 5'- translasyon yapılmamış bölgesine stabilizasyon sekanslarının sokulması yoluyla elde edilebilir.

Yukarıda bahsedildiği gibi burada tanımlanan nükleik asit sekansları, nükleotit analogları/modifikasyonları, örn. omurga modifikasyonları, şeker modifikasyonları veya baz modifikasyonları ihtiva edebilir. Mevcut buluş bağlamında bir omurga modifikasyonu, burada tanımlanan adı geçen nükleik asit sekansları içinde bulunan

25

nükleotitlerin omurgasının fosfatlarının kimyasal olarak modifiye edildiği bir modifikasyondur. Mevcut buluşla bağlantılı olarak bir şeker modifikasyonu, burada tanımlanan nükleik asit sekanslarının nükleotitlerinin şekerinin kimyasal bir modifikasyonudur. Ek olarak
 5 mevcut buluşla bağlantılı olarak bir baz modifikasyonu, nükleik asit sekanslarının nükleik asit molekülünün nükleotitlerinin baz yarımının kimyasal bir modifikasyonudur. Bu bağlamda nükleotit analogları veya modifikasyonları tercihen transkripsiyon ve/veya translasyon için uygulanabilen nükleotit analogları arasından seçilir.

10

Mevcut buluşun birinci yönünün özellikle tercih edilen bir düzeneğinde burada tanımlanan nükleotit analogları/modifikasyonları, şifrelenen proteinin ekspresyonunu ilave olarak arttıran ve tercihen 2-amino-6-kloropurinribosid-5'-trifosfat, 2-aminoadenosin-5'-trifosfat,
 15 2-tiyositidin-5'-trifosfat, 2-tiyoüridin-5'-trifosfat, 4-tiyoüridin-5'-trifosfat, 5-aminoallilsitidin-5'-trifosfat, 5-aminoallilüridin-5'-trifosfat, 5-bromositidin-5'-trifosfat, 5-bromoüridin-5'-trifosfat, 5-iyodositidin-5'-trifosfat, 5-iodoüridin-5'-trifosfat, 5-metilsitidin-5'-trifosfat, 5-metilüridin-5'-trifosfat, 6-azasitidin-5'-trifosfat, 6-azaüridin-5'-
 20 trifosfat, 6-kloropurinribosid-5'-trifosfat, 7-deazaadenosin-5'-trifosfat, 7-deazaguanosin-5'-trifosfat, 8-azaadenosin-5'-trifosfat, 8-azidoadenosin-5'-trifosfat, benzimidazol-ribosid-5'-trifosfat, N1-metiladenosin-5'-trifosfat, N1-metilguanosen-5'-trifosfat, N6-metiladenosin-5'-trifosfat, O6-metilguanosen-5'-trifosfat,
 25 pseudoüridin-5'-trifosfat veya puromisin-5'-trifosfat, ksantosin-5'-trifosfat arasından seçilen baz modifikasyonları arasından seçilir. Baz modifikasyonları için 5-metilsitidin-5'-trifosfat, 7-deazaguanosin-5'-trifosfat, 5-bromositidin-5'-trifosfat ve psödoüridin-5'-trifosfattan

oluşan baz modifiye edilmiş nükleotit grubundan seçilen nükleotitler özel olarak tercih edilir.

Başka bir düzeneğe göre burada tanımlandığı gibi, özellikle buluşa ait
 5 kitin veya parça kitinin nükleik asit sekansları, bir lipit modifikasyonu
 ihtiva edebilir. Lipit modifikasyonlu böyle bir nükleik asit tipik olarak
 burada tanımlandığı gibi bir nükleik asit içerir. Burada tanımlandığı
 gibi adı geçen nükleik asit sekanslarının lipit ile modifiye edilmiş
 nükleik asit böyle bir nükleik asidi tipik olarak ayrıca bu nükleik asit
 10 molekülü ile kovalent şekilde bağlanmış en az bir bağlayıcı ve ilgili
 bağlayıcı ile kovalent şekilde bağlanmış en az bir lipit içerir.
 Alternatif olarak lipit ile modifiye edilmiş nükleik asit molekülü,
 burada tanımlandığı gibi en az bir nükleik asit molekülü ve bu nükleik
 asit molekülü ile kovalent şekilde (bir bağlayıcı olmadan) bağlanmış
 15 en az bir (iki fonksiyonlu) lipit içerir. Üçüncü bir alternatifte göre lipit
 ile modifiye edilmiş nükleik asit molekülü, burada tanımlandığı gibi
 bir nükleik asit molekülü, bu nükleik asit molekülü ile kovalent
 şekilde bağlanmış en az bir bağlayıcı ve ilgili bağlayıcı ile kovalent
 şekilde bağlanmış en az bir lipit ve ayrıca bu nükleik asit molekülü ile
 20 kovalent şekilde (bir bağlayıcı olmadan) bağlanmış en az bir (iki
 fonksiyonlu) lipit içerir. Bu bağlamda lipit modifikasyonunun, buluşa
 ait lineer bir nükleik asit sekansının terminal uçlarında bulunması
 özellikle tercih edilir.

25 Buluşun birinci yönünün tercih edilen başka bir düzeneğine göre,
 burada tanımlandığı gibi, özellikle buluşa ait kitin veya parça kitinin
 nükleik asit sekansı, özellikle (m)RNA'lar olarak sağlandıysa, bilinen

adıyla bir "5' CAP" yapısı ilave edilerek RNaz'lar tarafından degradasyona karşı stabilize edilebilir.

Buluşun birinci yönüne göre, burada tanımlandığı gibi, özellikle
 5 buluşa ait kitin veya parça kitinin nükleik asit sekansları, en az 10
 sitidinlik, tercihen en az 20 sitidinlik, daha fazla tercihen en az 30
 sitidinlik bir sekans (bilinen adıyla "poli(C) sekansı") ile modifiye
 edilir. Özellikle adı geçen nükleik asit sekansları, tipik olarak yaklaşık
 10 ila 200 sitidin nükleotitlik, tercihen yaklaşık 10 ila 100 sitidin
 10 nükleotitlik, daha fazla tercihen yaklaşık 10 ila 70 sitidin nükleotitlik
 veya hatta daha fazla tercihen yaklaşık 20 ila 50 veya hatta 20 ila 30
 sitidin nükleotitlik bir poli(C) sekansı ihtiva edebilir veya bunun için
 kodlama yapabilir. Bu poli(C) sekansı tercihen adı geçen nükleik
 asitler, özellikle mevcut buluşun birinci yönüne göre buluşa ait kit
 15 veya parça kitinin nükleik asitleri içinde bulunan kodlama bölgesinin
 3' 'üne konumlandırılır.

Mevcut buluşun özellikle tercih edilen bir düzeneğinde bir tümör
 antijeni veya bunun bir fragmanını, varyantını veya türevini içeren en
 20 az bir peptidi veya proteini şifreleyen, burada tanımlandığı gibi buluşa
 ait nükleik asit sekansının kodlama bölgesinin G/C içeriği, bunun özel
 vahşi tip kodlama bölgesinin, yani modifiye edilmemiş kodlama
 bölgesinin G/C içeriğine kıyasla modifiye edilmiş, özellikle
 arttırılmıştır. Kodlama bölgesinin şifrelenmiş amino asit sekansı, özel
 25 vahşi tip kodlama bölgesinin kodlanmış amino asit sekansına kıyasla
 tercihen modifiye edilmemiştir.

Burada tanımlandığı gibi, özellikle buluşa ait kitin veya parça kitinin

- nükleik asit sekanslarının kodlama bölgesinin G/C içeriğinin modifikasyonu, translasyon yapılacak bir mRNA bölgesinin sekansının, bu mRNA'nın verimli translasyonu için önemli olduğu gerçeğine dayanır. Böylelikle çeşitli nükleotitlerin kompozisyonu ve sekansı önemlidir. Özellikle G (guanosin)/C (sitosin) içeriği artmış olan mRNA sekansları, A (adenosin)/U (ürasil) içeriği artmış olan mRNA sekanslarından daha stabildir. Buluşa göre kodlama bölgesinin kodonları böylelikle bunun vahşi tip kodlama bölgesine kıyasla değiştirilirken translasyon yapılmış amino asit sekansı, arttırılmış miktarda G/C nükleotidi içerecek şekilde korunur. Birkaç kodonun, bir ve aynı amino asit için kodlama yaptığı (bilinen adıyla genetik kodun dejenerasyonu) olgusu bağlamında stabilite için en istenilen kodonlar belirlenebilir (bilinen adıyla alternatif kodon kullanımı).
- 15 Burada tanımlandığı gibi, özellikle buluşa ait kitin veya parça kitinin nükleik asit sekanslarının kodlama bölgesi tarafından şifrelenen amino aside bağlı olarak nükleik asit sekansının, örn. kodlama bölgesinin bunun vahşi tip kodlama bölgesine kıyasla modifikasyonu için çeşitli olasılıklar vardır. Sadece G veya C nükleotitleri ihtiva eden kodonlar tarafından şifrelenen amino asitler söz konusu olduğunda kodonda hiçbir modifikasyon gerekmez. Böylelikle Pro'ya (CCC veya CCG), Arg'ye (CGC veya CGG), Ala'ya (GCC veya GCG) ve Gly'ye (GGC veya GGG) yönelik kodonlar, A veya U bulunmadığından modifikasyon gerektirmez.

25

Buna karşılık A ve/veya U nükleotitleri ihtiva eden kodonlar, aynı amino asitler için kodlama yapan, ancak A ve/veya U ihtiva etmeyen

başka kodonların ikamesi suretiyle modifiye edilebilir. Bunların örnekleri şunlardır:

Pro'ya ait kodonlar, CCU veya CCA'dan CCC veya CCG şeklinde modifiye edilebilir;

- 5 Arg'ye ait kodonlar, CGU veya CGA veya AGA veya AGG'den CGC veya CGG şeklinde modifiye edilebilir;

Ala'ya ait kodonlar, GCU veya GCA'dan GCC veya GCG şeklinde modifiye edilebilir;

- 10 Gly'ye ait kodonlar, GGU veya GGA'dan GGC veya GGG şeklinde modifiye edilebilir.

- Diğer durumlarda A veya U nükleotitleri, kodonlardan elimine edilememekle birlikte daha düşük A ve/veya U nükleotidi içeriği ihtiva eden kodonlar kullanılarak A ve U içeriğinin azaltılması mümkün olur. Bunların örnekleri şunlardır:

Phe'ye ait kodonlar, UUU'dan UUC şeklinde modifiye edilebilir;

Leu'ya ait kodonlar, UUA, UUG, CUU veya CUA'dan CUC veya CUG şeklinde modifiye edilebilir;

- 20 Ser'ye ait kodonlar, UCU veya UCA veya AGU'dan UCC, UCG veya AGC şeklinde modifiye edilebilir;

Tyr'ye ait kodon, UAU'dan UAC şeklinde modifiye edilebilir;

Cys'ye ait kodon, UGU'dan UGC şeklinde modifiye edilebilir;

His'ye ait kodon, CAU'dan CAC şeklinde modifiye edilebilir;

Gln'ye ait kodon, CAA'dan CAG şeklinde modifiye edilebilir;

- 25 Ile'ye ait kodonlar, AUU veya AUA'dan AUC şeklinde modifiye edilebilir;

Thr'ye ait kodonlar, ACU veya ACA'dan ACC veya ACG şeklinde modifiye edilebilir;

Asn'ye ait kodon, AAU'dan AAC şeklinde modifiye edilebilir;
 Lys'ye ait kodon, AAA'dan AAG şeklinde modifiye edilebilir;
 Val'ye ait kodonlar, GUU veya GUA'dan GUC veya GUG şeklinde
 modifiye edilebilir;

- 5 Asp'ye ait kodon, GAU'dan GAC şeklinde modifiye edilebilir;
 Glu'ye ait kodon, GAA'dan GAG şeklinde modifiye edilebilir;
 durdurma kodonu UAA, UAG veya UGA şeklinde modifiye edilebilir.

- Diğer taraftan Met (AUG) ve Trp (UGG) kodonlarının durumunda
 10 sekans modifikasyonu imkanı yoktur.

- Yukarıda sıralanan ikameler, tek tek veya burada tanımlandığı gibi
 buluşa ait nükleik asit sekansının kodlama bölgesinin G/C içeriğini,
 bunun özel vahşi tip kodlama bölgesine (yani orijinal sekansa) kıyasla
 15 arttırmak için bütün olası kombinasyonlarda kullanılabilir. Bu nedenle
 örneğin vahşi tip sekansta meydana gelen Thr'ye ait tüm kodonlar,
 ACC (veya ACG) şeklinde modifiye edilebilir.

- Yukarıdaki bağlamda mRNA kodonları gösterilir. Bu nedenle bir
 20 mRNA içinde bulunan üridin ayrıca özel mRNA için kodlama yapan
 ilgili DNA içinde timidin olarak var olabilir.

- Tercihen burada tanımlandığı gibi buluşa ait nükleik asit sekansının
 kodlama bölgesinin G/C içeriği, vahşi tip kodlama bölgesinin G/C
 25 içeriğine kıyasla en az %7, daha fazla tercihen en az %15, özellikle
 tercihen en az %20 oranında artmıştır. Spesifik bir düzeneğe göre, bir
 tümör antijeni veya bunun bir fragmanını, varyantını veya türevini
 içeren en az bir peptidi veya proteini şifreleyen kodlama bölgesi

içindeki ikame edilebilir kodonların en az %5, %10, %20, %30, %40, %50, %60'ı, daha fazla tercihen en az %70'i, hatta daha fazla tercihen en az %80'i ve en fazla tercihen en az %90, %95 veya hatta %100'ü, ikame edilir, böylelikle adı geçen kodlama bölgesinin G/C içeriği
5 arttırılır.

Bu bağlamda, burada tanımlandığı gibi, özellikle buluşa ait kitin veya parça kitinin nükleik asit sekanslarının kodlama bölgesinin G/C içeriğinin, vahşi tip kodlama bölgesine kıyasla maksimuma (yani
10 ikame edilebilir kodonların %100'ü) çıkarılması özellikle tercih edilebilir.

Buluşa göre bir tümör antijeni veya bunun bir fragmanını, varyantını veya türevini içeren en az bir peptidi veya proteini şifreleyen, burada tanımlandığı gibi, özellikle buluşa ait kitin veya parça kitinin nükleik asit sekanslarına ait kodlama bölgesinin tercih edilen başka bir modifikasyonu, translasyon verimliliğinin ayrıca hücreler içinde tRNA'ların meydana gelmesinde farklı bir frekans ile belirlendiğine dair bulguya dayanır. Böylelikle bilinen adıyla “nadir kodonlar”, adı
15 geçen nükleik asit sekanslarının kodlama bölgesi içinde arttırılmış bir dereceye kadar mevcut ise karşılık gelen modifiye edilmiş nükleik asit sekansı, nispeten “sık” tRNA'ları kodlayan kodonların mevcut olduğu durumdan anlamlı düzeyde daha zayıf derecede translasyon yapılır.

25 Bu bağlamda, burada tanımlandığı gibi, özellikle buluşa ait kitin veya parça kitinin nükleik asit sekanslarının kodlama bölgesi tercihen hücre içinde nispeten nadir olan bir tRNA için kodlama yapan vahşi tip sekansının en az bir kodonu, hücre içinde nispeten sık olan bir tRNA

için kodlama yapan ve nispeten nadir tRNA ile aynı amino asidi taşıyan bir kodon ile değiştirilecek şekilde, karşılık gelen vahşi tip kodlama bölgesine kıyasla modifiye edilir. Bu modifikasyon sayesinde adı geçen nükleik asit sekanslarının kodlama bölgesi, bunlar için sıklıkla meydana gelen tRNA'ların mevcut olduğu kodonlar sokulacak şekilde modifiye edilir. Başka bir deyişle, buluşa göre, bu modifikasyon vasıtasıyla vahşi tip kodlama bölgesinin, hücre içinde nispeten nadir olan bir tRNA'yı kodlayan bütün kodonları, her durumda hücre içinde nispeten sık olan bir tRNA'yı kodlayan ve her durumda nispeten nadir tRNA ile aynı amino asidi taşıyan bir kodonla değiştirilebilir.

Hangi tRNA'ların hücre içinde nispeten sık meydana geldiği ve buna karşılık hangilerinin nispeten nadir olduğu, teknikte uzman kişilerce bilinir; bakınız örn. Akashi, Curr. Opin. Genet. Dev. 2001, 11 (6): 660-666. Belirli amino asit için en sık meydana gelen tRNA'yı kullanan kodonlar, örn. (insan) hücresinde en sık meydana gelen tRNA'yı kullanan Gly kodonu özellikle tercih edilir.

Buluşa göre burada tanımlandığı gibi, özellikle buluşa ait kitin veya parça kitinin nükleik asit sekansının kodlama bölgesinde artmış, özellikle maksimize edilmiş olan sıralı G/C içeriğinin, adı geçen nükleik asit sekanslarının kodlama bölgesi tarafından şifrelenen peptitlerin veya proteinlerin amino asit sekansını modifiye etmeden "sık" kodonlar ile birleştirilmesi özellikle tercih edilebilir. Bu tercih edilen düzenek, burada tanımlandığı gibi özellikle verimli şekilde translasyon yapılmış ve stabilize edilmiş (modifiye edilmiş) nükleik asit sekanslarının sağlanmasına izin verir.

Buluşun birinci yönünün tercih edilen başka bir düzeneğine göre, burada tanımlandığı gibi, özellikle buluşa ait kitin veya parça kitinin nükleik asit sekansı, tercihen ek olarak en az bir 5' ve/veya 3' stabilize edici sekansa sahiptir. 5' ve/veya 3' translasyon yapılmamış bölgelerdeki bu stabilize edici sekanslar, nükleik asidin, özellikle sitosol içindeki mRNA'nın yarı ömrünün arttırılması etkisine sahiptir. Bu stabilize edici sekanslar, virüsler, bakteriler ve ökaryotlar içerisinde meydana gelen ve ayrıca kısmen veya bütünüyle sentetik olabilen, doğal yollarla meydana gelen sekanslar ile %100 sekans özdeşliğine sahip olabilir. Örn., Homo sapiens veya Xenopus laevis'ten (alfa-)globin geninin translasyon yapılmamış sekansları (UTR), mevcut buluşta stabilize edilmiş bir nükleik asit için kullanılabilecek stabilize edici sekanslara örnek olarak verilebilir. Stabilize edici bir sekansın başka bir örneği, (C/U)CCAN_xCCC(U/A)Py_xUC(C/U)CC genel formülüne sahiptir ki bu, bir (alfa-)globin, tip(I)-kolajen, 15-lipoksijenaz veya tirosin-hidroksilazı kodlayan çok stabil RNA'ların 3'-UTR'sinde bulunur (bakınız Holcik ve arkadaşları, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 1997, 94: 2410'dan 2414'e). Bu stabilize edici sekanslar şüphesiz tek başlarına veya birbirleri ile kombinasyon halinde ve ayrıca teknikte uzman kişilerce bilinen diğer stabilize edici sekanslar ile kombinasyon halinde kullanılabilir. Bu bağlamda alfa globin geninin 3' UTR sekansının, bir tümör antijeni veya bunun bir fragmanını, varyantını veya türevini içeren en az bir peptidi veya proteini şifreleyen, burada tanımlandığı gibi, özellikle mevcut buluşun birinci yönüne göre buluşa ait kitin veya parça kitinin nükleik asit sekansları içinde bulunan kodlama bölgesinin 3' üne konumlanması özellikle tercih edilir.

Bazların ikameleri, ilaveleri veya eliminasyonları tercihen burada tanımlandığı gibi, özellikle buluşa ait kitin veya parça kitinin nükleik asit sekansları ile, nükleik asit sekansının hazırlanmasına yönelik bir DNA matrisi kullanılarak, iyi bilinen sahaya yönelik mutajenez teknikleri ile veya bir oligonükleotit ligasyon stratejisi ile gerçekleştirilir (bakınız örn. Maniatis ve arkadaşları, Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press, 3rd ed., Cold Spring Harbor, NY, 2001).

- 10 Yukarıdaki modifikasyonlardan biri, burada tanımlandığı gibi buluşa ait kitin veya parça kitinin nükleik asit sekanslarına ve ayrıca mevcut buluş bağlamında kullanılan bir nükleik aside uygulanabilir ve uygun veya gerekli ise, herhangi bir kombinasyonda birbirleri ile birleştirilebilir, ancak bu modifikasyon kombinasyonlarının, ilgili
- 15 nükleik asit içinde birbirlerine müdahale etmemeleri gerekir. Bu konuda uzman bir kişi, seçimini buna göre yapabilecektir.

Burada tanımlandığı gibi, özellikle burada tanımlandığı gibi mevcut buluşa uygun buluşa ait kitin veya parça kitinin nükleik asit sekansları, örn. katı faz sentezi gibi sentetik yöntemlerin yanı sıra in vitro yöntemler, örneğin in vitro transkripsiyon reaksiyonları veya in vivo reaksiyonlar, örneğin in vivo DNA plazmidlerinin bakteriler içinde çoğaltılması dahil olmak üzere, teknikte bilinen herhangi bir yöntem kullanılarak hazırlanabilir.

25

Böyle bir proseste burada tanımlandığı gibi, özellikle buluşa ait kitin veya parça kitinin nükleik asit sekanslarının hazırlanması için, özellikle nükleik asit, bir mRNA formunda ise karşılık gelen bir DNA

molekölü, in vitro transkripte edilebilir. Bu DNA matrisi tercihen in vitro transkripsiyon için uygun bir promoter, örn. bir T7 veya SP6 promoteri içerir, bunu ise hazırlanacak nükleik asit molekülü, örn. mRNA için arzu edilen nükleotit sekansı ve in vitro transkripsiyon için bir sonlandırma sinyali takip eder. Söz konusu en az bir RNA matrisini oluşturan DNA molekülü, fermentatif proliferasyon ve ardından bakterilerde replike edilebilecek bir plazmidin parçası olarak izolasyon yoluyla hazırlanabilir. Mevcut buluş için uygun şekilde bahsedilebilecek plazmidler, örn. pT7Ts plazmidleri (GenBank erişim numarası U26404; Lai ve arkadaşları, Development 1995, 121: 2349'dan 2360'a), pGEM® serisi, örn. pGEM®-1 (GenBank erişim numarası X65300; Promega'dan) ve pSP64'tür (GenBank erişim numarası X65327); bakınız ayrıca Mezei and Storts, Purification of PCR Products, in: Griffin and Griffin (ed.), PCR Technology: Current Innovation, CRC Press, Boca Raton, FL, 2001.

Burada tanımlandığı gibi nükleik asit sekanslarının yanı sıra adı geçen nükleik asit sekansları tarafından şifrelenen proteinler veya peptitler, bu sekansların fragmanlarını veya varyantlarını içerebilir. Bu fragmanlar veya varyantlar tipik olarak yukarıda bahsedilen nükleik asitlerden biri ile veya buluşa ait nükleik asit sekansı tarafından şifrelenmiş ise, proteinlerin veya peptitlerin veya sekansların biri ile, nükleik asit düzeyinde veya amino asit düzeyinde, bütün vahşi tip sekansa göre en az %5, %10, %20, %30, %40, %50, %60, tercihen en az %70, daha fazla tercihen en az %80, eşit şekilde daha fazla tercihen en az %85, hatta daha fazla tercihen en az %90 ve en fazla tercihen en az %95 veya hatta %97, %98 veya %99 oranında sekans özdeşliğine sahip bir sekans içerebilir.

Mevcut buluş bağlamında (örn. burada tanımlandığı gibi, özellikle buluşa ait kitin veya parça kitinin nükleik asit sekansları tarafından şifrelenen) proteinlerin veya peptitlerin "fragmanları", amino asit sekansı (veya bunun şifrelenmiş nükleik asit molekülü) bağlamında,

5 orijinal (doğal) proteinin amino asit sekansına (veya bunun şifrelenmiş nükleik asit molekülüne) kıyasla N terminalinden, C terminalinden ve/veya sekans içinden kesilmiş/kısaltılmış, burada tanımlandığı gibi bir protein veya peptit sekansı içerebilir. Bu kesme böylelikle amino asit düzeyinde veya karşılık gelen şekilde nükleik asit düzeyinde

10 meydana gelebilir. Burada tanımlandığı gibi böyle bir fragmana göre bir sekans özdeşliği bu nedenle tercihen burada tanımlandığı gibi bütün proteine veya peptide veya böyle bir proteinin veya peptidin tüm (kodlayıcı) nükleik asit molekülüne karşılık gelebilir. Benzer şekilde mevcut buluş bağlamında nükleik asitlerin "fragmanları",

15 nükleik asit molekülü açısından, orijinal (doğal) nükleik asit molekülüne kıyasla 5', 3' ve/veya sekans içinden kesilmiş/kısaltılmış, burada tanımlandığı gibi bir nükleik asit sekansı içerebilir. Burada tanımlandığı gibi böyle bir fragmana göre bir sekans özdeşliği bu nedenle tercihen burada tanımlandığı gibi bütün nükleik aside karşılık

20 gelir ve tercih edilen sekans özdeşliği düzeyi tipik olarak burada gösterildiği gibidir. Fragmanlar, tam uzunlukta doğal peptide veya proteine, örn. bunun spesifik antijenik veya terapötik özelliğine kıyasla, (uygun bir fonksiyonel deneyde, örn. bir immünolojik reaksiyonu, örn. (immün reaksiyonun bir göstergesi olarak) uygun bir

25 sitokinin ekspresyonunu ve/veya salgılanmasını ölçen, örn. uygun bir deney sistemi ile antijenik özelliği değerlendiren bir deneyde ölçüldüğünde) doğal tam uzunlukta protein ile aynı biyolojik fonksiyona veya spesifik aktiviteye sahiptir veya bunun bir aktivitesini

en az %50, daha fazla tercihen en az %70, hatta daha fazla tercihen en az %90 oranında muhafaza eder. Buna göre tercih edilen bir düzenekte "fragman", tam uzunlukta (doğal yoldan meydana gelen) tümör antijenik proteinin, burada gösterildiği gibi immün sisteme
5 tümör antijenik özellikler veren bir kısmıdır.

Mevcut buluş bağlamında (örn. burada tanımlandığı gibi, özellikle buluşa ait kitin veya parça kitinin nükleik asit sekansları tarafından şifrelenen) proteinlerin veya peptitlerin fragmanları ayrıca burada
10 tanımlandığı gibi bir proteinin veya peptidin, yaklaşık 6 ila yaklaşık 20 veya hatta daha fazla amino asitlik bir uzunluğa sahip bir sekansını, örn. MHC sınıf I molekülleri tarafından işlenen ve sunulan, tercihen yaklaşık 8 ila yaklaşık 10 amino asitlik, örn., 8, 9 veya 10 (veya hatta 6, 7, 11 veya 12 amino asitlik) bir uzunluğa sahip fragmanlar veya
15 MHC sınıf II molekülleri tarafından işlenen ve sunulan, tercihen yaklaşık 13 veya daha fazla amino asitlik, örn. 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20 veya hatta daha fazla amino asitlik bir uzunluğa sahip fragmanlar içerebilir, buradaki bu fragmanlar, amino asit sekansının herhangi bir kısmından seçilebilir. Bu fragmanlar tipik olarak T
20 hücreleri tarafından, peptit fragmanından ve bir MHC molekülünden oluşan bir kompleks formunda tanınır, yani fragmanlar tipik olarak doğal formlarında tanınmaz. Burada tanımlandığı gibi proteinlerin veya peptitlerin fragmanları, bu proteinlerin veya peptitlerin en az bir epitopunu içerebilir. Ek olarak bir proteinin sahalarının, örneğin hücre
25 dışı sahası, hücre içi sahası veya transmembran sahasının ve bir proteinin kısaltılmış veya kesilmiş versiyonlarının da bir proteinin bir fragmanını içerdiği anlaşılabilir.

Burada tanımlandığı gibi (örn. burada tanımlandığı gibi buluşa ait nükleik asit sekansı tarafından şifrelenen) proteinlerin veya peptitlerin fragmanları ayrıca bu proteinlerin veya peptitlerin epitoplarını içerebilir. Mevcut buluş bağlamında proteinlerin T hücresi epitopları veya parçaları, tercihen yaklaşık 6 ila yaklaşık 20 veya hatta daha fazla amino asitlik bir uzunluğa sahip fragmanları, örn. MHC sınıf I molekülü tarafından işlenen ve sunulan, tercihen yaklaşık 8 ila yaklaşık 10 amino asitlik, örn., 8, 9 veya 10 (veya hatta 11 veya 12 amino asitlik) bir uzunluğa sahip fragmanları veya MHC sınıf II molekülü tarafından işlenen ve sunulan, tercihen yaklaşık 13 veya daha fazla amino asitlik, örn. 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20 veya hatta daha fazla amino asitlik bir uzunluğa sahip fragmanları içerebilir, buradaki bu fragmanlar, amino asit sekansının herhangi bir kısmından seçilebilir. Bu fragmanlar tipik olarak T hücreleri tarafından, peptit fragmanından ve bir MHC molekülünden oluşan bir kompleks formunda tanınır, yani fragmanlar tipik olarak doğal formlarında tanınmaz.

B hücresi epitopları tipik olarak burada tanımlandığı gibi (doğal) protein veya peptit antijenlerinin dış yüzeyi üzerinde bulunan, tercihen 5 ila 15 amino aside, daha fazla tercihen 5 ila 12 amino aside, hatta daha fazla tercihen 6 ila 9 amino aside sahip, antikorlar tarafından yani doğal formlarında tanınabilen fragmanlardır.

Proteinlerin veya peptitlerin bu epitopları ayrıca bu proteinlerin veya peptitlerin burada bahsedilen varyantlarından herhangi birinden seçilebilir. Bu bağlamda antijenik determinantlar, burada tanımlandığı gibi proteinlerin veya peptitlerin segmentlerinden oluşan, burada

tanımlandığı gibi proteinlerin veya peptitlerin amino asit sekansında süreksiz olan, ancak üç boyutlu yapıda bir araya getirilmiş olan konformasyonel veya süreksiz epitoplar veya tek bir polipeptit zincirinden oluşan sürekli veya lineer epitoplar olabilir.

5

Mevcut açıklama bağlamında tanımlandığı gibi proteinlerin veya peptitlerin "varyantları", burada tanımlandığı gibi nükleik asit sekansı tarafından şifrelenebilir. Böylelikle bir protein veya peptit, bir veya daha fazla (2, 3, 4, 5, 6, 7 veya daha fazla) mutasyon, örneğin bir veya daha fazla ikame edilmiş, sokulmuş ve/veya delete edilmiş amino asit açısından orijinal sekanstan farklılık gösteren bir amino asit sekansına sahip olacak şekilde üretilebilir. "Varyantların" tam uzunlukta doğal protein sekansı açısından tercih edilen sekans özdeşliği düzeyi tipik olarak burada gösterildiği gibidir. Tercihen varyantlar, tam uzunlukta doğal peptide veya proteine, örn. bunun spesifik antijenik özelliğine kıyasla, (uygun bir fonksiyonel deneyde, örn. bir immünolojik reaksiyonu, bir veya daha fazla sitokinin salgılanması ve/veya ekspresyonu yoluyla tümör antijenine karşı değerlendiren bir deney ile ölçüldüğünde) doğal tam uzunlukta protein ile aynı biyolojik fonksiyona veya spesifik aktiviteye sahiptir veya bunun bir aktivitesini en az %50, daha fazla tercihen en az %70, hatta daha fazla tercihen en az %90 oranında muhafaza eder. Buna göre tercih edilen bir düzenekte "varyant", bir tümör antijenik proteinin, burada gösterildiği gibi derecede tümör antijenik özellikler veren bir varyantıdır.

25

Mevcut buluş bağlamında tanımlanan (örn. burada tanımlandığı gibi bir nükleik asit tarafından şifrelenen) proteinlerin veya peptitlerin "varyantları", bunların doğal, yani mutasyona uğramamış fizyolojik

- sekansına kıyasla konservatif amino asit ikamesi(leri) içerebilir. Bu amino asit sekanslarının yanı sıra bunların şifreleyici nükleotit sekansları özellikle burada tanımlandığı gibi varyant terimi kapsamına girer. Aynı sınıftan kaynaklanan amino asitlerin birbirleri ile
- 5 değiştirildiği ikameler, konservatif ikameler olarak adlandırılır. Özellikle bunlar, alifatik yan zincirlere, pozitif veya negatif yüklü yan zincirlere, yan zincirlerde veya amino asitlerde aromatik gruplara sahip amino asitler olup bunların yan zincirleri, hidrojen köprülerine girebilir, örneğin yan zincirleri bir hidroksil fonksiyonuna sahip
- 10 olabilir. Bunun anlamı, örn., bir polar yan zincire sahip bir amino asidin, benzer şekilde bir polar yan zincire sahip başka bir amino asit ile değiştirilmesi veya örneğin bir hidrofobik yan zincir ile karakterize edilen bir amino asidin, benzer şekilde bir hidrofobik yan zincire sahip başka bir amino asit ile (örn., serin (treonin), treonin (serin) ile veya
- 15 lösin (izolösün), izolösün (lösün) ile) ikame edilmesi anlamına gelir. Özellikle üç boyutlu yapıda modifikasyona neden olmayan veya bağlanma bölgesini etkilemeyen sekans pozisyonlarında sokmalar ve ikameler mümkündür. Sokma(lar) veya delesyon(lar) yoluyla üç boyutlu yapıda modifikasyonlar, örn. CD spektrumları (dairesel
- 20 dikroizm spektrumları) kullanılarak kolayca belirlenebilir (Urry, 1985, Absorption, Circular Dichroism and ORD of Polypeptides, in: Modern Physical Methods in Biochemistry, Neuberger ve arkadaşları (ed.), Elsevier, Amsterdam).
- 25 Ek olarak burada tanımlandığı gibi, burada tanımlandığı gibi, özellikle buluşa ait kitin veya parça kitinin nükleik asit sekansı tarafından şifrelenebilen proteinlerin veya peptitlerin varyantları ayrıca nükleik asidin nükleotitlerinin, proteinin veya peptidin ilgili amino asit sekansı

değiştirilmeden genetik kodun dejenerasyonuna göre değiştirildiği, yani amino asit sekansının veya en azından bunun bir kısmının, yukarıdaki anlam kapsamında bir veya daha fazla mutasyonda orijinal sekanstan farklılık göstermeyebileceği sekanslar içerebilir.

5

İki sekansın, örn. burada tanımlandığı gibi nükleik asit sekanslarının veya amino asit sekanslarının, tercihen burada tanımlandığı gibi, özellikle buluşa ait kitin veya parça kitinin nükleik asit sekansları tarafından şifrelenen amino asit sekanslarının özdeş olma yüzdesini belirlemek için sekanslar, daha sonra birbirleri ile karşılaştırılmak üzere hizalanabilir. Böylelikle örn. bir birinci sekansın bir pozisyonu, ikinci sekansın karşılık gelen pozisyonu ile karşılaştırılabilir. Birinci sekanstaki bir pozisyon, ikinci sekanstaki bir pozisyonda aynı bileşen tarafından işgal edilmişse bu pozisyonda iki sekans özdeştir. Durum böyle değilse sekanslar, bu pozisyonda farklılık gösterir. İkinci sekansta, birinci sekansa kıyasla sokmalar meydana gelirse ileri hizalama yapmak için birinci sekansa boşluklar sokulabilir. İkinci sekansta, birinci sekansa kıyasla delesyonlar meydana gelirse ileri hizalama yapmak için ikinci sekansa boşluklar sokulabilir. İki sekansın özdeşlik yüzdesi ise sadece bir sekansta işgal edilen pozisyonlar dahil olmak üzere toplam pozisyon sayısına bölünmüş özdeş pozisyonların sayısının bir fonksiyonudur. İki sekansın özdeş olma yüzdesi, matematiksel bir algoritma kullanılarak belirlenebilir. Kullanılabilecek matematiksel bir algoritmanın tercih edilen, ancak sınırlayıcı olmayan bir örneği, Karlin ve arkadaşlarının (1993), PNAS USA, 90:5873-5877 veya Altschul ve arkadaşlarının (1997), Nucleic Acids Res., 25:3389-3402 algoritmasıdır. Böyle bir algoritma, BLAST

25

programına dahil edilmiştir. Mevcut buluşun sekanslarına belirli bir dereceye kadar özdeş olan sekanslar, bu program ile tanımlanabilir.

Burada tanımlandığı gibi nükleik asit sekansları, bir peptidin veya
 5 proteinin türevlerini şifreleyebilir. Bir peptidin veya proteinin böyle bir türevi, adı geçen peptit veya protein gibi başka bir molekülden türetilmiş bir moleküldür. Bir "türev" tipik olarak doğal bir peptidin veya proteinin tam uzunlukta sekansını ve örn. N veya C terminalinde ilave sekans özellikleri ihtiva eder, doğal tam uzunlukta
 10 peptide/proteine ilave bir fonksiyon sergileyebilir. Yine bu türevler, tam uzunlukta doğal peptide veya proteine, örn. bunun spesifik terapötik özelliğine kıyasla, (uygun bir fonksiyonel deneyde, yukarı bakınız, örn. bir immünolojik reaksiyonda sitokin ekspresyonu ve/veya salgılanması yoluyla ifade edildiği gibi ölçüldüğünde) doğal
 15 tam uzunlukta protein ile aynı biyolojik fonksiyona veya spesifik aktiviteye sahiptir veya bunun bir aktivitesini en az %50, daha fazla tercihen en az %70, hatta daha fazla tercihen en az %90 oranında muhafaza eder. Bu şekilde bir peptidin veya proteinin bir "türevi" ayrıca mevcut buluşta kullanılan bir peptidi veya proteini içeren
 20 (kimerik) füzyon peptitleri/proteinlerini veya örn. füzyon peptidine/proteinine iki veya daha fazla biyolojik fonksiyon kazandıran ayrı bir peptide/proteine füzyonla birleştirilmiş doğal tam uzunlukta bir proteini (veya bunun varyantını/fragmanını) kapsar. Örneğin füzyon, bir etiket, örneğin bir epitop, örn. bir FLAG epitopu veya bir V5 epitopu veya bir HA epitopu içerir. Örneğin epitop, bir
 25 FLAG epitopudur. Böyle bir takı örneğin füzyon proteininin saflaştırılması için faydalıdır.

Bu bağlamda bir proteinin veya peptidin bir "varyantı", böyle bir proteinin veya peptidin 10, 20, 30, 50, 75 veya 100 amino asidinden oluşan bir küme üzerinde en az %70, %75, %80, %85, %90, %95, %98 veya %99 amino asit özdeşliğine sahip olabilir. Benzer şekilde

5 bir nükleik asit sekansının veya özellikle bir fragmanın bir "varyantı", böyle bir nükleik asit sekansının 10, 20, 30, 50, 75 veya 100 nükleotidinden oluşan bir bir küme üzerinde en az %70, %75, %80, %85, %90, %95, %98 veya %99 nükleotit özdeşliğine sahip olabilir; ancak tipik olarak doğal yoldan meydana gelen tam uzunlukta

10 sekanslara karşılık gelir. "Fragmanlar" söz konusu olduğunda tipik olarak sekans özdeşliği, fragman için tam uzunlukta proteinin (fragman ile aynı uzunluğu yansıtır), en yüksek düzeyde sekans özdeşliği sergileyen kısmı üzerinde (fragmanın) uzunluk boyunca belirlenir.

15

Mevcut buluşun birinci yönünün tercih edilen başka bir düzeneğinde, burada tanımlandığı gibi, özellikle buluşa ait kitin veya parça kitinin nükleik asit sekansları, buluşa ait nükleik asit sekansının transfeksiyon verimini ve/veya immüno-uyarıcı özelliklerini arttırmak amacıyla bir

20 araç, transfeksiyon veya kompleksleştirme ajanı ile birleştirilir. Bu bağlamda transfeksiyon verimini arttırmak için uygun, özellikle tercih edilen ajanlar, katyonik veya polikasyonik bileşikler, örneğin protamin, nükleolin, spermin veya spermidin veya diğer katyonik peptitler veya proteinler, örneğin poli-L-lizin (PLL), poli-arginin,

25 bazik polipeptitler, hücreye penetre eden peptitler (CPP'ler), örneğin HIV bağlayıcı peptitler, HIV-1 Tat (HIV), Tat türevli peptitler, Penetratin, VP22 türevli veya analog peptitler, HSV VP22 (Herpes simplex), MAP, KALA veya protein transdüksiyon alanları (PTD'ler,

PpT620, prolin bakımından zengin peptitler, arginin bakımından zengin peptitler, lizin bakımından zengin peptitler, MPG-peptit(ler), Pep-1, L-oligomerler, Kalsitonin peptit(ler), Antenapedi türevli peptitler (özellikle *Drosophila antennapedia*'dan), pAntp, plsl, FGF, 5 Laktoferin, Transportan, Buforin-2, Bac715-24, SynB, SynB(1), pVEC, hCT türevli peptitler, SAP veya histonlardır. Ek olarak tercih edilen katyonik veya polikasyonik proteinler veya peptitler, aşağıdaki toplam formüle sahip aşağıdaki proteinler veya peptitler arasından seçilebilir: $(Arg)_l;(Lys)_m;(His)_n;(Orn)_o;(Xaa)_x$, buradaki $l + m + n + o$ 10 $+ x = 8-15$ 'tir ve birbirinden bağımsız olarak l, m, n veya $o, 0, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14$ veya 15 arasından seçilen herhangi bir sayı olabilir, ancak genel Arg, Lys, His ve Orn içeriği, oligopeptidin bütün amino asitlerinin en az %50'sini temsil etmelidir; ve Xaa, Arg, Lys, His veya Orn dışında doğal (= doğal yollarla 15 meydana gelen) veya doğal olmayan amino asitler arasından seçilen herhangi bir amino asit olabilir; ve $x, 0, 1, 2, 3$ veya 4 arasından seçilen herhangi bir sayı olabilir; ancak genel Xaa içeriği, oligopeptidin bütün amino asitlerinin %50'sini aşmamalıdır. Bu bağlamda özellikle tercih edilen katyonik peptitler, örn. Arg₇, Arg₈, 20 Arg₉, H₃R₉, R₉H₃, H₃R₉H₃, YSSR₉SSY, (RKH)₄, Y(RKH)₂R, vb.dir. Transfeksiyon ajanı olarak kullanılabilen diğer tercih edilen katyonik veya polikasyonik bileşikler arasında katyonik polisakaritler, örneğin çitosan, polibren, katyonik polimerler, örn. polietilenimin (PEI), katyonik lipidler, örn. DOTMA: [1-(2,3-sioleiloksi)propil]-N,N,N-trimetilamonyum klorid, DMRIE, di-C14-amidin, DOTIM, SAINT, 25 DC-Chol, BGTC, CTAP, DOPC, DODAP, DOPE: Dioleil fosfatidiletanolamin, DOSPA, DODAB, DOIC, DMEPC, DOGS: Dioktadesilamidoglisilspermin, DIMRI: Dimiristo-oksiopropil dimetil

hidroksietil amonyum bromid, DOTAP: dioleoiloksi-3-(trimetilamonyo)propan, DC-6-14: O,O-ditetradekanoil-N-(α -trimetilamonyoasetil)dietanolamin klorid, CLIP1: rac-[(2,3-dioktadesiloksipropil)(2-hidroksietil)]-dimetilamonyum klorid, CLIP6: rac-[2(2,3-diheksadesiloksipropil-oksimetiloksi)etil] trimetilamonyum, CLIP9: rac-[2(2,3-diheksadesiloksipropil-oksisukiniloksi)etil]-trimetilamonyum, oligofektamin veya katyonik veya polikasyonik polimerler, örn. modifiye edilmiş poliaminoasitler, örneğin β -aminoasit-polimerler veya tersine çevrilmiş poliamidler, vb., modifiye edilmiş polietilenler, örneğin PVP (poli(N-etil-4-vinilpiridinyum bromid)), vb., modifiye edilmiş akrilatlar, örneğin pDMAEMA (poli(dimetilaminoetil metilakrilat)), vb., modifiye edilmiş Amidoaminler örneğin pAMAM (poli(amidoamin)), vb., modifiye edilmiş polibetaaminoester (PBAE), örneğin diamin uç modifikasyonlu 1,4 butandiol diakrilat-ko-5-amino-1-pentanol polimerler, vb., dendrimerler örneğin polipropilamin dendrimerler veya pAMAM bazlı dendrimerler, vb., poliimin(ler), örneğin PEI: poli(etilenimin), poli(propilenimin), vb., poliallilamin, şeker omurgası bazlı polimerler örneğin siklodekstrin bazlı polimerler, dekstran bazlı polimerler, çitosan, vb., silan omurgası bazlı polimerler, örneğin PMOXA-PDMS kopolimerler, vb., bir veya daha fazla katyonik bloğun (örn. yukarıda bahsedildiği gibi bir katyonik polimerden seçilir) ve bir veya daha fazla hidrofilik veya hidrofobik bloğun (örn. polietilenglikol) bir kombinasyonundan oluşan blok polimerler; vb. bulunabilir.

Bu bağlamda burada tanımlandığı gibi, özellikle buluşa ait kitin veya parça kitinin nükleik asitleri, bir katyonik veya polikasyonik bileşik,

tercihen katyonik proteinler veya peptitler ile en azından kısmen kompleksleştirilir. Kısmen, adı geçen nükleik asitlerin sadece bir kısmının, bir katyonik veya polikatonik bileşik ile kompleksleştirilmesi ve adı geçen nükleik asitlerin geri kalanının 5 kompleksleşmemiş formda ("serbest") olması anlamına gelir. Tercihen kompleksleştirilmiş nükleik asidin serbest nükleik aside oranı, yaklaşık 5:1 (a/a) ile yaklaşık 1:10 (a/a)'lık bir aralıktan, daha fazla tercihen yaklaşık 4:1 (a/a) ile 1:8 (a/a)'lık bir aralıktan, hatta daha fazla tercihen yaklaşık 3:1 (a/a) ile yaklaşık 1:5 (a/a) veya 1:3 (a/a)'lık 10 bir aralıktan seçilir ve en fazla tercihen kompleksleştirilmiş nükleik asidin serbest nükleik aside oranı, yaklaşık 1:1 (a/a)'lık bir orandan seçilir.

Burada tanımlandığı gibi, özellikle buluşa ait kitin veya parça kitinin 15 nükleik asit sekanslarının, çıplak formda veya örn. herhangi bir kimyasal yapıdaki polikatonik bileşikler, tercihen polikatonik (poli)peptitler veya sentetik polikatonik bileşikler ile kompleksleşmiş halde sunulması tercih edilir. Tercihen adı geçen nükleik asit sekansları, bir paketleme hücresi ile birlikte sunulmaz.

20

Bir başka yönde buluş, kitler veya parça kitilerle ilgili olarak burada tanımlandığı gibi nükleik asit sekanslarını içeren bir kompozisyon sunar. Buluşa ait bu kompozisyonlar böylelikle buradaki kite veya parça kitie istinaden tanımlandığı gibi, farklı tümör antijenleri veya 25 bunların fragmanlarını, varyantlarını veya türevlerini içeren farklı peptitleri veya proteinleri şifreleyen, burada tanımlandığı gibi birden fazla nükleik asit sekansı içerir.

Burada tanımlandığı gibi birçok nükleik asit sekansı (tipik olarak 1, 2, 3, 4, 5, 6'dan fazla veya 10'dan fazla nükleik asit, örn. 2 ila 10, tercihen 2 ila 5 nükleik asit anlamına gelir) içeren, özellikle küçük olmayan akciğer kanseri (NSCLC) tedavisinde kullanılmaya yönelik, buluşa ait kompozisyon, en azından şunları içerir:

a) aşağıdakileri içeren veya bunlar için kodlama yapan bir nükleik asit sekansı

- i. NY-ESO-1 tümör antijenini veya bunun bir fragmanını, varyantını veya türevini içeren en az bir peptidi veya proteini şifreleyen bir kodlama bölgesi,
- ii. en az bir histon sap-ilmigi, ve
- iii. bir poli(A) sekansı veya bir poliadenilasyon sinyali;

b) en az bir peptidi veya proteini şifreleyen buluşa ait bir nükleik asit, burada adı geçen şifrelenmiş peptit veya protein, 5T4 tümör antijenini veya bunun bir fragmanını, varyantını veya türevini içerir; ve

c) en az bir peptidi veya proteini şifreleyen buluşa ait bir nükleik asit, burada adı geçen şifrelenmiş peptit veya protein, Survivin tümör antijenini veya bunun bir fragmanını, varyantını veya türevini içerir; ve

d) en az bir peptidi veya proteini şifreleyen buluşa ait bir nükleik asit, burada adı geçen şifrelenmiş peptit veya protein, MAGE-C1 tümör antijenini veya bunun bir fragmanını, varyantını veya türevini içerir; ve

e) en az bir peptidi veya proteini şifreleyen buluşa ait bir nükleik asit, burada adı geçen şifrelenmiş peptit veya protein, MAGE-C2 tümör antijenini veya bunun bir fragmanını, varyantını veya türevini içerir;

burada NY-ESO-1, 5T4, survivin, MAGE-C1 veya MAGE-C2 fragmanı, en az altı amino asit artığı uzunluğundadır; burada her nükleik asit sekansı A, B, C, D veya E - 5' 'ten 3' 'e doğrultuda - aşağıdakileri içerir veya bunlar için kodlama yapar

5 i)

- a) kodlama bölgesi,
- b) en az bir histon sap-ilmliği ve
- c) bir poli(A) sekansı;

ya da

10 ii)

- a) kodlama bölgesi,
- b) bir poli(A) sekansı, ve
- c) en az bir histon sap-ilmliği;

burada i) veya ii)'deki en az bir histon sap-ilmliği, burada tanımlandığı gibi formül (I) veya (II) arasından seçilir;

burada

sap1 ve sap2, birbirleri ile baz eşleşmesi yaparak bir geri komplementer sekans oluşturabilir, burada baz eşleşmesi, sap1 ve sap2 arasında meydana gelebilir, veya

20 bir kısmen geri komplementer sekans oluşturabilir, burada sap1 ve sap2 arasında eksik bir baz eşleşmesi meydana gelebilir; ve

burada her nükleik asit A, B, C, D veya E ayrıca en az 10 sitidin nükleotit içeren bir poli(C) sekansı içerir veya bunun için kodlama yapar.

25

Bir başka yöne göre mevcut buluş ayrıca şifrelenmiş bir peptidin veya proteinin ekspresyonunu arttırmaya yönelik, örn. a) buluşa ait kitin veya parça kitinin veya buluşa ait kompozisyonun sağlanması, b)

burada tanımlandığı gibi birçok nükleik asit sekansı içeren buluşa ait kitin veya parça kitinin veya buluşa ait kompozisyonun, bir ekspresyon sistemine, örn. hücresiz bir ekspresyon sistemine, bir hücreye (örn. bir ekspresyon konakçı hücreesine veya bir somatik hücreye), bir dokuya veya bir organizmaya verilmesi veya uygulanması adımlarını içeren bir in vitro yöntem sunar. Yöntem, peptitlerin veya proteinlerin laboratuvar, araştırma, tanı, ticari üretimi için ve/veya terapötik amaçlarla uygulanabilir. Bu bağlamda tipik olarak burada tanımlandığı gibi birçok nükleik asit sekansı içeren, burada tanımlandığı gibi buluşa ait kitin veya parça kitinin veya buluşa ait kompozisyonun hazırlanmasından sonra bu tipik olarak hücresiz bir ekspresyon sistemine, bir hücreye (örn. bir ekspresyon konakçı hücreesine veya bir somatik hücreye), bir dokuya veya bir organizmaya, örn. çıplak veya kompleksleştirilmiş formda veya burada tanımlandığı gibi bir farmasötik kompozisyon veya aşı formunda, tercihen transfeksiyon yoluyla ya da burada tarif edilen uygulama yollarından biri kullanılarak verilir veya uygulanır. Yöntem, in vitro gerçekleştirilir. Yöntem ayrıca spesifik bir hastalığın tedavisi, özellikle tercihen burada tanımlandığı gibi kanserin veya tümör hastalıklarının tedavisi bağlamında gerçekleştirilebilir.

Bu bağlamda "in vitro", burada tanımlandığı gibi buluşa ait kitin veya parça kitinin nükleik asitlerinin ya da burada tanımlandığı gibi birçok nükleik asit sekansı içeren buluşa ait kompozisyonun, bir organizmanın dışında kültür içinde hücrelere transfeksiyonu veya transdüksiyonu olarak burada tanımlanır; "in vivo", buluşa ait kitin veya parça kitinin nükleik asitlerinin ya da burada tanımlandığı gibi birçok nükleik asit sekansı içeren buluşa ait kompozisyonun, adı

geçen nükleik asitlerin veya adı geçen kompozisyonun bütün organizmaya veya kişiye verilmesi suretiyle hücreler içine transfeksiyonu veya transdüksiyonu olarak burada tanımlanır ve "ex vivo", buluşa ait kitin veya parça kitinin nükleik asitlerinin ya da
5 burada tanımlandığı gibi birçok nükleik asit (tipik olarak 1, 2, 3, 4, 5, 6'dan fazla veya 10'dan fazla nükleik asit, örn. 2 ila 10, tercihen 2 ila 5 nükleik asit anlamına gelir) sekansı içeren buluşa ait kompozisyonun, bir organizmanın veya kişinin dışında hücrelere transfeksiyonu veya transdüksiyonu ve ardından transfekte edilmiş hücrelerin organizmaya
10 veya kişiye verilmesi olarak burada tanımlanır.

Benzer şekilde başka bir yöne göre mevcut buluş ayrıca burada tanımlandığı gibi buluşa ait kitin veya parça kitinin veya burada tanımlandığı gibi birçok nükleik asit sekansı içeren buluşa ait
15 kompozisyonun, tercihen tanı veya terapötik amaçlarla, örn. burada tanımlandığı gibi buluşa ait kitin veya parça kitinin veya burada tanımlandığı gibi birçok nükleik asit sekansı içeren buluşa ait kompozisyonun örn. hücresiz bir ekspresyon sistemine, bir hücreye (örn. bir ekspresyon konakçı hücrelerine veya somatik bir hücreye), bir
20 dokuya veya bir organizmaya verilmesi veya uygulanması suretiyle, şifrelenmiş bir peptidin veya proteinin in vitro ekspresyonunu arttırmak amacıyla kullanılması ile ilgilidir. Kullanım, peptitlerin veya proteinlerin laboratuvar, araştırma, tanı, ticari üretimi için ve/veya terapötik amaçlarla uygulanabilir. Bu bağlamda tipik olarak burada
25 tanımlandığı gibi buluşa ait kitin veya parça kitinin nükleik asit sekansları veya burada tanımlandığı gibi birçok nükleik asit sekansı içeren buluşa ait kompozisyonun hazırlanmasından sonra bunlar tipik olarak hücresiz bir ekspresyon sistemine, bir hücreye (örn. bir

ekspresyon konakçı hücrelerine veya bir somatik hücreye), bir dokuya veya bir organizmaya, tercihen çıplak formda veya kompleksleştirilmiş formda veya burada tanımlandığı gibi bir farmasötik kompozisyon veya aşı formunda, tercihen transfeksiyon yoluyla ya da burada tarif edilen uygulama yollarından biri kullanılarak verilir veya uygulanır. Kullanım, in vitro gerçekleştirilir. Kullanım ayrıca spesifik bir hastalığın tedavisi, özellikle tercihen burada tanımlandığı gibi kanserin veya tümör hastalıklarının tedavisi bağlamında gerçekleştirilebilir.

10

Burada tanımlandığı gibi nükleik asit sekanslarını içeren bir ekspresyon sistemi veya burada tanımlandığı gibi bir ekspresyon vektörü veya plazmid de öngörülür. Bu bağlamda ekspresyon sistemi, hücresiz bir ekspresyon sistemi (örn. bir in vitro transkripsiyon/translasyon sistemi), bir hücreli ekspresyon sistemi (örn. memeli hücreleri örneğin CHO hücreleri, böcek hücreleri, maya hücreleri, bakteri hücreleri örneğin E. coli) veya peptitlerin veya proteinlerin ekspresyonu için kullanılan organizmalar (örn. bitkiler veya hayvanlar örneğin inekler) olabilir.

20

Ek olarak burada tanımlandığı gibi, özellikle buluşa ait kitin veya parça kitinin nükleik asitleri veya burada tanımlandığı gibi birçok nükleik asit sekansı içeren buluşa ait kompozisyon; örn. burada tanımlandığı gibi, özellikle buluşa ait kitin veya parça kitinin nükleik asitlerinin veya burada tanımlandığı gibi birçok buluşa ait nükleik asit sekansı içeren buluşa ait kompozisyonun bir hücreye (örn. bir ekspresyon konakçı hücrelerine veya somatik bir hücreye), bir dokuya veya bir organizmaya, tercihen çıplak formda veya

25

kompleksleştirilmiş formda ya da burada tarif edildiği gibi bir farmasötik kompozisyon veya aşı halinde, daha fazla tercihen burada tarif edilen uygulama yollarından herhangi biri kullanılarak uygulanması veya verilmesi suretiyle şifrelenmiş bir peptidin veya
 5 proteinin ekspresyonunu arttırmak amaçlı, örn. tercihen burada tanımlandığı gibi bir kanserin veya tümör hastalığının tedavisi amaçlı farmasötik bir kompozisyonun hazırlanmasında kullanılabilir.

Buna göre özellikle tercih edilen bir yönde mevcut buluş ayrıca buluşa
 10 ait bir kit veya parça kiti ya da burada tanımlandığı gibi birçok nükleik asit sekansı içeren buluşa ait bir kompozisyon ve isteğe bağlı olarak farmasötik açıdan kabul edilebilir bir taşıyıcı ve/veya araç içeren farmasötik bir kompozisyon sunar.

15 Birinci muhteviyat olarak buluşa ait farmasötik kompozisyon, burada kit veya parça kiti bağlamında tanımlanan nükleik asitleri içerir.

İkinci muhteviyat olarak buluşa ait farmasötik kompozisyon, isteğe bağlı olarak en az bir ilave farmasötik açıdan aktif bileşen içerebilir.
 20 Bu bağlamda farmasötik açıdan aktif bir bileşen, burada bahsedilen belirli bir indikasyonu veya hastalığı, tercihen kanseri veya tümör hastalıklarını iyileştirmek, hafifletmek veya önlemek üzere terapötik bir etkiye sahip bir bileşiktir. Bu gibi bileşikler arasında, herhangi sınırlama kast edilmeden, tercihen burada tanımlandığı gibi peptitler
 25 veya proteinler, tercihen burada tanımlandığı gibi nükleik asitler, (terapötik açıdan aktif) düşük moleküler ağırlıklı organik veya inorganik bileşikler (moleküler ağırlık 5000'in altında, tercihen 1000'in altındadır), tercihen burada tanımlandığı gibi şekerler,

antijenler veya antikorlar, bilinen teknikte hali hazırda bilinen terapötik ajanlar, antijenik hücreler, antijenik hücresel fragmanlar, hücresel fraksiyonlar; modifiye edilmiş, atenüe veya deaktive edilmiş (örn., kimyasal olarak veya ışıma yoluyla) hücre çeperi bileşenleri, tercihen burada tanımlandığı gibi patojenler (virüs, bakteri, vb.), vb. yer alır.

Ek olarak buluşa ait farmasötik kompozisyon, farmasötik açıdan kabul edilebilir bir taşıyıcı ve/veya araç içerebilir. Mevcut buluş bağlamında farmasötik açıdan kabul edilebilir taşıyıcı tipik olarak buluşa ait farmasötik kompozisyonun sıvı veya sıvı olmayan bazını içerir. Buluşa ait farmasötik kompozisyon, sıvı formda sunulursa taşıyıcı tipik olarak pirojensiz su; izotonik tuz veya tamponlu (sulu) çözeltiler, örn., fosfat, sitrat vb. tamponlu çözeltiler olacaktır. Enjeksiyon tamponu, spesifik referans ortamına istinaden hipertonic, izotonik veya hipotonik olabilir, yani tampon, spesifik referans ortamına istinaden daha yüksek, aynı veya daha düşük bir tuz içeriğine sahip olabilir; burada tercihen yukarıda bahsedilen tuzların, ozmoz veya diğer konsantrasyon etkilerinden dolayı hücrelerde hasara yol açmayan konsantrasyonları kullanılabilir. Referans ortamları, örn. “in vivo” yöntemlerde ortaya çıkan sıvılar, örn. kan, lenf, sitosolik sıvılar veya diğer vücut sıvıları veya örn. ortak tamponlar veya sıvılar gibi “in vitro” yöntemlerde referans ortamlar olarak kullanılabilen sıvılardır. Bu gibi ortak tamponlar veya sıvılar, uzman kişilerce bilinir. Bir sıvı bazı olarak Ringer-Laktat çözeltisi özellikle tercih edilir.

Bununla birlikte tedavi edilecek bir hastaya uygulanmaya uygun, bir veya daha fazla uyumlu katı veya sıvı dolgu maddesi veya seyrelticiler

veya kapsül haline getirici bileşikler de buluşa ait farmasötik kompozisyon için kullanılabilir. Burada kullanıldığı gibi "uyumlu" terimi, buluşa ait farmasötik kompozisyonun bu bileşenlerinin, buluşa ait farmasötik kompozisyonun farmasötik etkinliğini tipik kullanma
 5 koşulları altında önemli ölçüde düşürecek hiçbir etkileşim meydana gelmeyecek şekilde burada tanımlandığı gibi nükleik asitler ile karıştırılabilmesi anlamına gelir.

Spesifik bir düzeneğe göre buluşa ait farmasötik kompozisyon, bir
 10 adjuvan içerebilir. Bu bağlamda bir adjuvan, doğuştan immün sisteminin bir immün tepkisini, yani spesifik olmayan bir immün tepkisini başlatmak veya arttırmak için uygun bir bileşik olarak anlaşılabilir. Başka bir deyişle buluşa ait farmasötik kompozisyon, uygulandığında, tercihen içinde isteğe bağlı olarak bulunan adjuvana
 15 bağlı olarak bir doğuştan immün tepkisi uyandırır. Tercihen böyle bir adjuvan, uzman bir kişi tarafından bilinen ve mevcut durum için uygun olan, yani bir memelide doğuştan immün tepkisini destekleyen bir adjuvan, örn. yukarıda tanımlandığı gibi bir adjuvan proteini veya aşağıda tanımlandığı gibi bir adjuvan arasından seçilebilir.

20

Depo ve verme için uygun adjuvanlar olarak, yukarıda buluşa ait nükleik asit sekansı için araç olarak tanımlanan katyonik veya polikasyonik bileşikler veya kompleksleştirme ajanı özellikle tercih edilir.

25

Buluşa ait farmasötik kompozisyon ek olarak arzu edilirse bunun immünojenikliğini veya immüno-uyarıcı kapasitesini arttırmak amacıyla bir veya daha fazla yardımcı madde ihtiva edebilir. Yukarıda

tanımlandığı gibi nükleik asit sekanslarının ve isteğe bağlı olarak buluşa ait farmasötik kompozisyon içinde bulunabilen bir yardımcı maddenin sinerjistik tesiri tercihen bu şekilde sağlanır. Yardımcı maddelerin çeşitli tiplerine bağlı olarak çeşitli mekanizmalar bu bağlamda ele alınabilir. Örneğin dendritik hücrelerin (DC'lerin) olgunlaşmasına izin veren bileşikler, örneğin lipopolisakaritler, TNF-alfa veya CD40 ligandı, uygun yardımcı maddelerin birinci sınıfını oluşturur. Genel olarak yardımcı madde olarak, immün sistemi bir “tehlike sinyali” şeklinde etkileyen herhangi bir ajan (LPS, GP96, vb.) veya bir immün tepkisinin, hedeflenen şekilde artmasına ve/veya etkilenmesine izin veren sitokinler, örn., GM-CSF kullanılması mümkündür. Özellikle tercih edilen yardımcı maddeler, doğuştan immün tepkisini ayrıca teşvik eden sitokinler, örn. monokinler, lenfokinler, interlökinler veya kemokinler, örn., 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-gama, GM-CSF, G-CSF, M-CSF, LT-beta veya TNF-alfa, büyüme faktörleri, örn., hGH'dir.

20

Buluşa ait farmasötik kompozisyon içerisine dahil edilebilen diğer katkı maddeleri, emülsiferler, örneğin Tween®; ıslatıcı ajanlar, örneğin sodyum lauril sülfat; renklendirici ajanlar; tat verici ajanlar, farmasötik taşıyıcılar; tablet oluşturucu ajanlar; stabilizerler; antioksidanlar; koruyuculardır.

25

Buluşa ait farmasötik kompozisyon ayrıca ek olarak insan Toll benzeri reseptörleri TLR1, TLR2, TLR3, TLR4, TLR5, TLR6, TLR7, TLR8,

TLR9, TLR10'a (ligandlar olarak) bağlanma afinitesi nedeniyle veya murin Toll benzeri reseptörler TLR1, TLR2, TLR3, TLR4, TLR5, TLR6, TLR7, TLR8, TLR9, TLR10, TLR11, TLR12 veya TLR13'e (ligandlar) olarak bağlanma afinitesi nedeniyle immün uyarıcı olduğu bilinen başka bir bileşik ihtiva edebilir.

Buluşa ait farmasötik kompozisyon, oral, parenteral yoldan, inhalasyon spreyi ile, topik, rektal, nazal, bukal, vajinal yoldan veya implante edilmiş bir rezervuar aracılığıyla uygulanabilir. Burada kullanıldığı gibi parenteral terimi, subkütan, intravenöz, intramüsküler, intra-artiküler, intra-sinoviyal, intrasternal, intratekal, intrahepatik, intralezyonal, intrakranyal, transdermal, intradermal, intrapulmonal, intraperitonel, intrakardiyal, intraarteriyel ve sublingual enjeksiyon veya infüzyon tekniklerini içerir.

15

Tercihen buluşa ait farmasötik kompozisyon, parenteral enjeksiyon yoluyla, daha fazla tercihen subkütan, intravenöz, intramüsküler, intra-artiküler, intra-sinoviyal, intrasternal, intratekal, intrahepatik, intralezyonal, intrakranyal, transdermal, intradermal, intrapulmonal, intraperitonel, intrakardiyal, intraarteriyel ve sublingual enjeksiyon yoluyla veya infüzyon teknikleri ile uygulanabilir. İntradermal ve intramüsküler enjeksiyon özellikle tercih edilir. Buluşa ait farmasötik kompozisyonların steril enjekte edilebilir formları, sulu veya yağlı süspansiyon olabilir. Bu süspansiyonlar, uygun disperse edici veya ıslatıcı ajanlar ve süspanse edici ajanlar kullanılarak teknikte bilinen tekniklere göre formüle edilebilir.

25

Burada tanımlandığı gibi buluşa ait farmasötik kompozisyon ayrıca

bunlarla sınırlı olmamakla birlikte kapsüller, tabletler, sulu süspansiyonlar veya çözeltiler dahil olmak üzere oral olarak kabul edilebilir bir dozaj formunda oral yoldan uygulanabilir.

- 5 Buluşa ait farmasötik kompozisyon ayrıca özellikle tedavi hedefi, örn. deri veya başka erişilebilir epitelial doku hastalıkları dahil, topik uygulama ile kolayca erişilebilen alanları veya organları içerdiğinde topik yoldan uygulanabilir. Uygun topik formülasyonlar, bu alanların veya organların her biri için kolayca hazırlanır. Topik uygulamalar
- 10 için buluşa ait farmasötik kompozisyon, bir veya daha fazla taşıyıcı içinde süspanse edilmiş veya çözülmüş olarak buluşa ait nükleik asidi ihtiva eden uygun bir merhem halinde formüle edilebilir.

- 15 Buluşa ait farmasötik kompozisyon tipik olarak buluşa ait farmasötik kompozisyonun bileşenlerinin, özellikle burada tanımlandığı gibi nükleik asit sekans(lar)ının "güvenli ve etkili bir miktarını" içerir. Burada kullanıldığı gibi "güvenli ve etkili bir miktar", burada tanımlandığı gibi nükleik asit sekans(lar)ının, burada tanımlandığı gibi bir hastalığın veya bozukluğun pozitif modifikasyonuna anlamlı
- 20 düzeyde neden olmak için yeterli bir miktarı anlamına gelir. Bununla birlikte aynı zamanda "güvenli ve etkili bir miktar", ciddi yan etkileri önlemek ve avantaj ve risk arasında makul bir ilişkiye izin vermek için yeterince küçüktür. Bu sınırların tespiti tipik olarak makul tıbbi karar çerçevesinde yapılır.

25

Buluşa ait farmasötik kompozisyon, insan ve ayrıca veterinerlik tıbbi amaçları ile, tercihen insan tıbbi amaçları ile, genel olarak farmasötik bir kompozisyon veya bir aşı halinde kullanılabilir.

Ozellikle tercih edilen başka bir yöne göre buluşa ait farmasötik kompozisyon (veya burada tanımlandığı gibi kit veya parça kiti veya burada tanımlandığı gibi birçok nükleik asit sekansı içeren buluşa ait kompozisyon), bir aşı halinde sağlanabilir veya kullanılabilir. Tipik olarak böyle bir aşı, yukarıda farmasötik kompozisyonlar için tanımlandığı gibidir. Ek olarak böyle bir aşı tipik olarak burada kit veya parça kiti veya burada tanımlandığı gibi birçok nükleik asit sekansı içeren buluşa ait kompozisyon bağlamında tanımlanan nükleik asitleri ihtiva eder.

10

Buluşa ait aşı ayrıca burada buluşa ait farmasötik kompozisyon için tanımlandığı gibi, farmasötik açıdan kabul edilebilir bir taşıyıcı, adjuvan ve/veya araç içerebilir. Buluşa ait aşının spesifik bağlamında farmasötik açıdan kabul edilebilir bir taşıyıcının seçimi, prensip olarak buluşa ait aşının uygulanma tarzıyla belirlenir. Buluşa ait aşı örneğin sistemik veya lokal yoldan uygulanabilir. Sistemik uygulama yolları genel olarak örneğin transdermal, oral, parenteral yollar, örneğin subkütan, intravenöz, intramüsküler, intraarteriyel, intradermal ve intraperitoneal enjeksiyonlar ve/veya intranazal uygulama yolları içerir. Lokal uygulama yolları genel olarak örneğin topik uygulama yolları içerir, ancak ayrıca intradermal, transdermal, subkütan veya intramüsküler enjeksiyonlar veya intralezyonal, intrakranyal, intrapulmonal, intrakardiyal ve sublingual enjeksiyonlar içerir. Daha fazla tercihen aşılar, intradermal, subkütan veya intramüsküler yolla uygulanabilir. Böylelikle buluşa ait aşılar tercihen sıvı (veya bazen katı) formda formüle edilir.

25

Buluşa ait aşı ek olarak arzu edilirse bunun immünojenikliğini veya

immüno-uyarıcı kapasitesini arttırmak amacıyla bir veya daha fazla yardımcı madde ihtiva edebilir. Farmasötik kompozisyon için tanımlanan adjuvanlar, yardımcı madde veya katkı maddeleri olarak özellikle tercih edilir.

5

Mevcut buluş ayrıca burada tanımlandığı gibi buluşa ait kitin veya parça kitinin veya burada tanımlandığı gibi birçok nükleik asit sekansı içeren buluşa ait kompozisyonun, buluşa ait farmasötik kompozisyonun, buluşa ait aşının birçok uygulamasını ve kullanımını
10 sunar, bunların tamamı, burada kit veya parça kiti bağlamında tanımlanan nükleik asit sekansını içerir.

Spesifik bir yöne göre mevcut buluş, burada tanımlandığı gibi buluşa ait kitin veya parça kitinin veya burada tanımlandığı gibi birçok
15 nükleik asit sekansı içeren buluşa ait kompozisyonun, tercihen kanserin veya tümör hastalıklarının tedavisinde bir ilaç olarak, tercihen bir aşı olarak ilk tıbbi kullanımına yöneliktir.

Ek olarak mevcut buluş, şunları içeren bir kit veya parça kiti ile
20 ilgilidir:

- A) bir kodlama bölgesi içeren veya bunun için kodlama yapan bir nükleik asit, burada kodlama bölgesi, NY-ESO-1 tümör antijenini veya bunun bir fragmanını içeren en az bir peptidi veya proteini şifreler;
- 25 B) bir kodlama bölgesi içeren veya bunun için kodlama yapan bir nükleik asit, burada kodlama bölgesi, 5T4 tümör antijenini veya bunun bir fragmanını içeren en az bir peptidi veya proteini şifreler;

C) bir kodlama bölgesi içeren veya bunun için kodlama yapan bir nükleik asit, burada kodlama bölgesi, survivin tümör antijenini veya bunun bir fragmanını içeren en az bir peptidi veya proteini şifreler;

5 D) bir kodlama bölgesi içeren veya bunun için kodlama yapan bir nükleik asit, burada kodlama bölgesi, MAGE-C1 tümör antijenini veya bunun bir fragmanını içeren en az bir peptidi veya proteini şifreler; ve

10 E) bir kodlama bölgesi içeren veya bunun için kodlama yapan bir nükleik asit, burada kodlama bölgesi, MAGE-C2 tümör antijenini veya bunun bir fragmanını içeren en az bir peptidi veya proteini şifreler,

burada NY-ESO-1, 5T4, survivin, MAGE-C1 veya MAGE-C2 fragmanı, en az altı amino asit artığı uzunluğundadır;

15 burada her nükleik asit sekansı A, B, C, D veya E - 5' 'ten 3' 'e doğrultuda - aşağıdakileri içerir veya bunlar için kodlama yapar

i)

a) kodlama bölgesi,

b) en az bir histon sap-ilmliği ve

20 c) bir poli(A) sekansı;

ya da

ii)

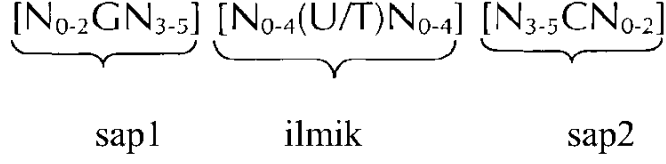
a) kodlama bölgesi,

b) bir poli(A) sekansı, ve

25 c) en az bir histon sap-ilmliği;

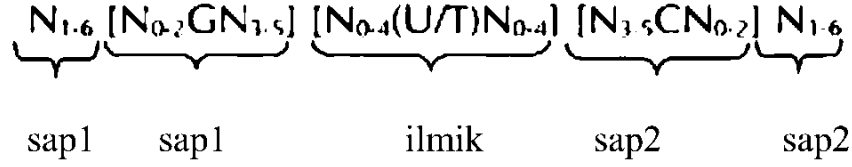
burada i) veya ii)'deki en az bir histon sap-ilmliği, aşağıdaki formül (I) veya (II) arasından seçilir:

formül (I) (sap sınırlama elemanları olmayan sap-ilmik sekansı):



5

formül (II) (sap sınırlama elemanları ile sap-ilmik sekansı):



10 sınırlama elemanı

sınırlama elemanı

burada:

sap1 veya sap2 sınırlama elemanları N_{1-6} , 1 ila 6, tercihen 2 ila 6, daha fazla tercihen 2 ila 5, hatta daha fazla tercihen 3 ila 5, en fazla tercihen
15 4 ila 5 veya 5 N'lik ardışık bir sekanstır, buradaki her N birbirinden bağımsız olarak A, U, T, G ve C arasından seçilen bir nükleotit ya da bunun bir nükleotit analogu arasından seçilir;

sap1 $[N_{0-2}GN_{3-5}]$, sap2 elemanı ile geri komplementer veya kısmen geri komplementerdir ve 5 ila 7 nükleotitlik ardışık bir sekanstır;

20 burada N_{0-2} , 0 ila 2, tercihen 0 ila 1, daha fazla tercihen 1 N'lik ardışık bir sekanstır, buradaki her N birbirinden bağımsız olarak A, U, T, G ve C arasından seçilen bir nükleotit ya da bunun bir nükleotit analogu arasından seçilir; burada N_{3-5} , 3 ila 5, tercihen 4 ila 5, daha fazla tercihen 4 N'lik ardışık bir sekanstır, buradaki her N birbirinden
25 bağımsız olarak A, U, T, G ve C arasından seçilen bir nükleotit ya da bunun bir nükleotit analogu arasından seçilir ve burada G, guanodin

veya bunun bir analogudur ve sap2'de bunun komplementer nükleotidi sitidinin guanosin ile değiştirilmesi koşuluyla isteğe bağlı olarak bir sitidin veya bunun bir analogu ile değiştirilebilir;

ilmik sekansı $[N_{0-4}(U/T)N_{0-4}]$, sap1 ve sap2 elemanları arasında
5 bulunur ve 3 ila 5 nükleotitlik, daha fazla tercihen 4 nükleotitlik ardışık bir sekanstır;

buradaki her N_{0-4} birbirinden bağımsız olarak 0 ila 4, tercihen 1 ila 3, daha fazla tercihen 1 ila 2 N'lik ardışık bir sekanstır, buradaki her N birbirinden bağımsız olarak A, U, T, G ve C arasından seçilen bir
10 nükleotit ya da bunun bir nükleotit analogu arasından seçilir; ve burada U/T, üridini ya da isteğe bağlı olarak timidini temsil eder;

sap2 $[N_{3-5}CN_{0-2}]$, sap1 elemanı ile geri komplementer veya kısmen geri komplementerdir ve 5 ila 7 nükleotitlik ardışık bir sekanstır; burada N_{3-5} , 3 ila 5, tercihen 4 ila 5, daha fazla tercihen 4 N'lik ardışık
15 bir sekanstır, buradaki her N birbirinden bağımsız olarak A, U, T, G ve C arasından seçilen bir nükleotit ya da bunun bir nükleotit analogu arasından seçilir;

burada N_{0-2} , 0 ila 2, tercihen 0 ila 1, daha fazla tercihen 1 N'lik ardışık bir sekanstır, buradaki her N birbirinden bağımsız olarak A, U, T, G veya C arasından seçilen bir nükleotit ya da bunun bir nükleotit
20 analogu arasından seçilir; ve

burada C, sitidin veya bunun bir analogudur ve sap1'de bunun komplementer nükleotidi guanosinin sitidin ile değiştirilmesi koşuluyla isteğe bağlı olarak bir guanosin veya bunun bir analogu ile
25 değiştirilebilir;

burada

sap1 ve sap2, birbirleri ile baz eşleşmesi yaparak bir geri komplementer sekans oluşturabilir, burada baz eşleşmesi, sap1 ve sap2 arasında meydana gelebilir, veya
 bir kısmen geri komplementer sekans oluşturabilir, burada sap1 ve
 5 sap2 arasında eksik bir baz eşleşmesi meydana gelebilir; veya
 bir ilaç olarak kullanılmaya yönelik, burada tanımlandığı gibi kompozisyon.

Bir başka yöne göre mevcut buluş, burada tanımlandığı gibi buluşa ait
 10 kitin veya parça kitinin veya burada tanımlandığı gibi birçok nükleik asit sekansı içeren buluşa ait kompozisyonun, burada tanımlandığı gibi kanserin ve tümör hastalıklarının tedavisi için ikinci tıbbi kullanımına, tercihen burada tanımlandığı gibi buluşa ait kitin veya parça kitinin veya burada tanımlandığı gibi birçok buluşa ait nükleik
 15 asit sekansı içeren buluşa ait kompozisyonun, burada tanımlandığı gibi bir farmasötik kompozisyonun veya aşının, burada tanımlandığı gibi kanserin veya tümör hastalıklarının profilaksına, tedavisine ve/veya iyileştirilmesine yönelik bir ilacın hazırlanmasında kullanılmasına yöneliktir. Tercihen farmasötik kompozisyon veya aşı,
 20 bu amaçlarla kullanılır veya buna ihtiyaç duyan bir hastaya uygulanacaktır.

Tercihen burada bahsedilen hastalıklar, kanser veya tümör hastalıkları arasından seçilir, bunlar ise tercihen örn. Akut lenfoblastik lösemi,
 25 Akut miyeloid lösemi, Adrenokortikal karsinoma, AIDS ile alakalı kanserler, AIDS ile alakalı lenfoma, Anal kanser, Apandis kanseri, Astrositoma, Bazal hücreli karsinoma, Safra kanalı kanseri, Mesane kanseri, Kemik kanseri, Osteosarkoma/Malignan fibröz histiositoma,

Beyin sapı glioma, Beyin tümörü, serebelar astrositoma, serebral astrositoma/malignan glioma, ependimoma, medulloblastoma, supratentoriyal primitif nöroektodermal tümörler, görme yolları ve hipotalamik glioma, Göğüs kanseri, Bronşiyal adenomalar
5 /karsinoidler, Burkitt lenfoma, çocukluk Karsinoid tümörü, gastrointestinal Karsinoid tümörü, bilinmeyen primer karsinoma, primer Merkezi sinir sistemi lenfoma, çocukluk Serebelar astrositoma, çocukluk Serebral astrositoma/Malignan glioma, Servikal kanser, Çocukluk kanserleri, Kronik lenfositik lösemi, Kronik miyelojen
10 lösemi, Kronik miyeloproliferatif bozukluklar, Kolon Kanser, Kütan T hücreli lenfoma, Dezmozplastik küçük yuvarlak hücreli tümör, Endometriyal kanser, Ependimoma, Ezofajel kanser, Ewing tümör familyasından Ewing's sarkoma, Çocukluk Ekstrakranyal germ hücreli tümör, Ekstragonadal Germ hücreli tümör, Ekstrahepatik safra kanalı
15 kanseri, İntraoküler melanoma, Retinoblastoma, Safra kesesi kanseri, Gastrik (Mide) kanseri, Gastrointestinal Karsinoid Tümör, Gastrointestinal stromal tümör (GIST), ekstrakranyal, ekstragonadal veya ovaryan Germ hücreli tümör, Gestasyonel trofoblastik tümör, Beyin sapı Glioma, Çocukluk Serebral Astrositoma, Çocukluk Görme
20 Yolu ve Hipotalamik Glioma, Gastrik karsinoid, Saç hücreli lösemi, Baş ve boyun kanseri, Kalp kanseri, Hepatoselüler (karaciğer) kanseri, Hodgkin lenfoma, Hipofarınjel kanser, çocukluk Hipotalamik ve görme yolu glioma, İntraoküler Melanoma, İletim Hücreli Karsinoma (Endokrin Pankreas), Kaposi sarkoma, Böbrek kanseri (renal hücreli
25 kanser), Larinjel Kanser, Lösemiler, akut lenfoblastik Lösemi, akut miyeloid Lösemi, kronik lenfositik Lösemi, kronik miyelojen Lösemi, saçaklı hücreli Lösemi, Dudak ve Oral Kavite Kanser, Liposarkoma, Karaciğer Kanser, Küçük Hücreli Olmayan Akciğer Kanser, Küçük

- Hücreli Akciğer Kanseri, Lenfomalar, AIDS ile alakalı Lenfoma, Burkitt Lenfoma, kütan T Hücreli Lenfoma, Hodgkin Lenfoma, Non-Hodgkin Lenfomalar, Primer Merkezi Sinir Sistemi Lenfoma, Waldenström Makroglobulinemi, Kemikte Malignan Fibröz
- 5 Histiositoma/Osteosarkoma, Çocukluk Meduloblastoma, Melanoma, İntraoküler (Göz) Melanoma, Merkel Hücreli Karsinoma, Erişkin Malignan Mezotelioma, Çocukluk Mezotelioma, Gizli Primerli Metastatik Skuamoz Boyun Kanseri, Ağız Kanseri, Çocukluk Multipl Endokrin Neoplazi Sendromu, Multipl Myeloma/Plazma Hücreli
- 10 Neoplazma, Mikoz Fungoidler, Miyelodisplastik Sendromlar, Miyelodisplastik/Miyeloproliferatif Hastalıklar, Kronik Miyeloid Lösemi, Erişkin Akut Miyeloid Lösemi, Çocukluk Akut Miyeloid Lösemi, Multipl Miyeloma (Kemik İliği Kanseri), Kronik Miyeloproliferatif Bozukluklar, Nazal kavite ve paranasal sinüs
- 15 kanseri, Nazofarinjel karsinoma, Nöroblastoma, Oral Kanser, Orofarinjel kanser, Osteosarkoma/kemikte malignan fibröz histiositoma, Yumurtalık kanseri, Yumurtalık epiteliyal kanser (Yüzey epiteliyal-stromal tümör), Yumurtalık germ hücreli tümör, Yumurtalık düşük malignan potansiyelli tümör, Pankreatik kanser, islet hücreli
- 20 Pankreatik kanser, Paranasal sinüs ve nazal kavite kanseri, Paratiroid kanseri, Penil kanser, Farinjel kanser, Feokromositoma, Pineal astrositoma, Pineal germinoma, çocukluk Pineoblastoma ve supratentorial primitif nöroektodermal tümörler, Pituitar adenoma, Plazma hücreli neoplazi/Multipl miyeloma, Plöropulmoner blastoma,
- 25 Primer merkezi sinir sistemi lenfoma, Prostat kanseri, Rektal kanser, Renal hücreli karsinoma (böbrek kanseri), Renal pelvis ve üreter kanseri, Retinoblastoma, çocukluk Rabdomiyosarkoma, Tükürük bezi kanseri, Ewign tümör familyasından Sarkoma, Kaposi Sarkoma,

yumuşak doku Sarkoma, uterin Sarkoma, Sézary sendromu, Cilt kanseri (nonmelanoma), Cilt kanseri (melanoma), Merkel hücreli Cilt karsinoma, İnce bağırsak kanseri, Skuamoz hücreli karsinoma, primeri gizli metastatik Skuamoz boyun kanseri, çocukluk Supratentorial primitif nöroektodermal tümör, Testis kanseri, Boğaz kanseri, çocukluk Timoma, Timoma ve Timik karsinoma, Tiroit kanseri, çocukluk Tiroit kanseri, Tranzisyonel hücreli renal pelvis ve üreter kanseri, gestasyonel Trofoblastik tümör, Uretral kanser, endometriyel Uterin kanseri, Uterin sarkoma, Vajina kanseri, çocukluk Görme yolu ve hipotalamik glioma, Vulvar kanser, Waldenström makroglobulinemi ve çocukluk Wilms tümörü (böbrek kanseri) içerir.

Ek olarak buluş, şunları içeren bir kit veya parça kiti sunar:

- A) bir kodlama bölgesi içeren veya bunun için kodlama yapan bir nükleik asit, burada kodlama bölgesi, NY-ESO-1 tümör antijenini veya bunun bir fragmanını içeren en az bir peptidi veya proteini şifreler;
- B) bir kodlama bölgesi içeren veya bunun için kodlama yapan bir nükleik asit, burada kodlama bölgesi, 5T4 tümör antijenini veya bunun bir fragmanını içeren en az bir peptidi veya proteini şifreler;
- C) bir kodlama bölgesi içeren veya bunun için kodlama yapan bir nükleik asit, burada kodlama bölgesi, survivin tümör antijenini veya bunun bir fragmanını içeren en az bir peptidi veya proteini şifreler;
- D) bir kodlama bölgesi içeren veya bunun için kodlama yapan bir nükleik asit, burada kodlama bölgesi, MAGE-C1 tümör antijenini veya bunun bir fragmanını içeren en az bir peptidi veya proteini şifreler; ve

E) bir kodlama bölgesi içeren veya bunun için kodlama yapan bir nükleik asit, burada kodlama bölgesi, MAGE-C2 tümör antijenini veya bunun bir fragmanını içeren en az bir peptidi veya proteini şifreler,

- 5 burada NY-ESO-1, 5T4, survivin, MAGE-C1 veya MAGE-C2 fragmanı, en az altı amino asit artığı uzunluğundadır; burada her nükleik asit sekansı A, B, C, D veya E - 5' 'ten 3' 'e doğrultuda - aşağıdakileri içerir veya bunlar için kodlama yapar

i)

- 10 a) kodlama bölgesi,
b) en az bir histon sap-ilmliği ve
c) bir poli(A) sekansı;

ya da

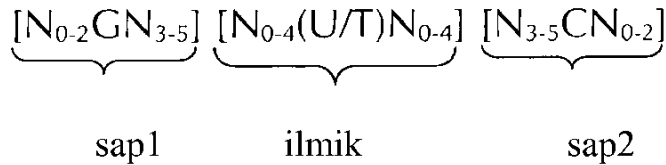
ii)

- 15 a) kodlama bölgesi,
b) bir poli(A) sekansı, ve
c) en az bir histon sap-ilmliği;

burada i) veya ii)'deki en az bir histon sap-ilmliği, aşağıdaki formül (I)

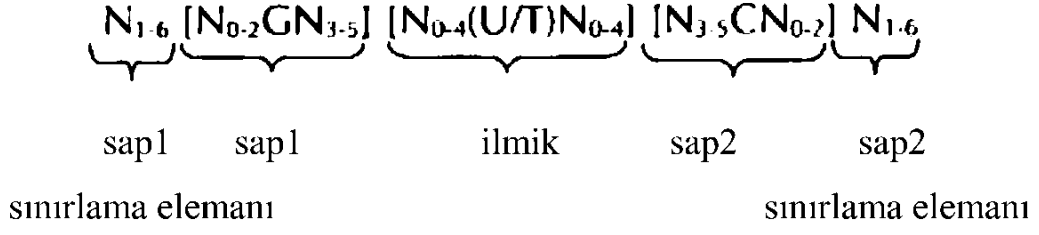
- 20 veya (II) arasından seçilir:

formül (I) (sap sınırlama elemanları olmayan sap-ilmik sekansı):



25

formül (II) (sap sınırlama elemanları ile sap-ilmik sekansı):



5 burada:

sap1 veya sap2 sınırlama elemanları N_{1-6} , 1 ila 6, tercihen 2 ila 6, daha fazla tercihen 2 ila 5, hatta daha fazla tercihen 3 ila 5, en fazla tercihen 4 ila 5 veya 5 N'lik ardışık bir sekanstır, buradaki her N birbirinden bağımsız olarak A, U, T, G ve C arasından seçilen bir nükleotit ya da
 10 bunun bir nükleotit analogu arasından seçilir;

sap1 $[N_{0-2}GN_{3-5}]$, sap2 elemanı ile geri komplementer veya kısmen geri komplementerdir ve 5 ila 7 nükleotitlik ardışık bir sekanstır; burada N_{0-2} , 0 ila 2, tercihen 0 ila 1, daha fazla tercihen 1 N'lik ardışık bir sekanstır, buradaki her N birbirinden bağımsız olarak A, U, T, G
 15 ve C arasından seçilen bir nükleotit ya da bunun bir nükleotit analogu arasından seçilir; burada N_{3-5} , 3 ila 5, tercihen 4 ila 5, daha fazla tercihen 4 N'lik ardışık bir sekanstır, buradaki her N birbirinden bağımsız olarak A, U, T, G ve C arasından seçilen bir nükleotit ya da bunun bir nükleotit analogu arasından seçilir ve burada G, guanosin
 20 veya bunun bir analogudur ve sap2'de bunun komplementer nükleotidi sitidinin guanosin ile değiştirilmesi koşuluyla isteğe bağlı olarak bir sitidin veya bunun bir analogu ile değiştirilebilir;

ilmik sekansı $[N_{0-4}(U/T)N_{0-4}]$, sap1 ve sap2 elemanları arasında bulunur ve 3 ila 5 nükleotitlik, daha fazla tercihen 4 nükleotitlik
 25 ardışık bir sekanstır;

buradaki her N_{0-4} birbirinden bağımsız olarak 0 ila 4, tercihen 1 ila 3, daha fazla tercihen 1 ila 2 N'lik ardışık bir sekanstır, buradaki her N

- birbirinden bağımsız olarak A, U, T, G ve C arasından seçilen bir nükleotit ya da bunun bir nükleotit analogu arasından seçilir; ve burada U/T, üridini ya da isteğe bağlı olarak timidini temsil eder;
- sap2 [$N_{3-5}CN_{0-2}$], sap1 elemanı ile geri komplementer veya kısmen
- 5 geri komplementerdir ve 5 ila 7 nükleotitlik ardışık bir sekanstır; burada N_{3-5} , 3 ila 5, tercihen 4 ila 5, daha fazla tercihen 4 N'lik ardışık bir sekanstır, buradaki her N birbirinden bağımsız olarak A, U, T, G ve C arasından seçilen bir nükleotit ya da bunun bir nükleotit analogu arasından seçilir;
- 10 burada N_{0-2} , 0 ila 2, tercihen 0 ila 1, daha fazla tercihen 1 N'lik ardışık bir sekanstır, buradaki her N birbirinden bağımsız olarak A, U, T, G veya C arasından seçilen bir nükleotit ya da bunun bir nükleotit analogu arasından seçilir; ve
- burada C, sitidin veya bunun bir analogudur ve sap1'de bunun
- 15 komplementer nükleotidi guanosinin sitidin ile değiştirilmesi koşuluyla isteğe bağlı olarak bir guanosin veya bunun bir analogu ile değiştirilebilir;
- burada
- sap1 ve sap2, birbirleri ile baz eşleşmesi yaparak bir geri
- 20 komplementer sekans oluşturabilir, burada baz eşleşmesi, sap1 ve sap2 arasında meydana gelebilir, veya
- bir kısmen geri komplementer sekans oluşturabilir, burada sap1 ve sap2 arasında eksik bir baz eşleşmesi meydana gelebilir; veya
- burada tanımlandığı gibi bir kompozisyon,
- 25 kanserin veya tümör hastalıklarının tedavisinde kullanılmaya yönelik.

Tercih edilen başka bir yönde burada tanımlandığı gibi buluşa ait kit veya parça kiti veya burada tanımlandığı gibi birçok nükleik asit

sekansı içeren buluşa ait kompozisyon, farmasötik bir kompozisyonun veya bir aşının hazırlanması amaçlı, özellikle burada tanımlanan amaçlarla kullanılabilir.

- 5 Buluşa ait farmasötik kompozisyon veya aşı ayrıca bir hastalığın veya bir bozukluğu, tercihen burada tanımlandığı gibi kanserin veya tümör hastalıklarının tedavisi için kullanılabilir.

- 10 Buluşa ait kitler, özellikle parça kitler tipik olarak tek başına bileşenler olarak ya da burada tanımlandığı gibi başka bileşenler, örneğin burada tanımlandığı gibi nükleik asit sekansları ile kombinasyon halinde, burada tanımlandığı gibi nükleik asit sekanslarını içeren buluşa ait farmasötik kompozisyonu veya aşırı içerebilir. Burada tanımlandığı gibi nükleik asit sekansları isteğe bağlı olarak burada tanımlandığı gibi başka bileşenler ile kombinasyon halindedir, burada nükleik asitler, bir veya daha fazla başka bileşen içeren kitin en az bir başka parçasından ayrı halde (kitin birinci parçası olarak) sunulur. Buluşa ait farmasötik kompozisyon ve/veya buluşa ait aşı, örn. kitin bir veya farklı parçaları içinde bulunabilir.
- 20 Örnek olarak örn. kitin en az bir parçası, burada tanımlandığı gibi en az bir nükleik asit sekansı içerebilir ve kitin en az bir başka parçası, burada tanımlandığı gibi en az bir başka bileşen içerebilir, örn. kitin en az bir başka parçası, en az bir farmasötik kompozisyon veya aşı içerebilir veya bunun bir parçası, örn. kitin en az bir parçası, burada tanımlandığı gibi bir nükleik asit sekansı içerebilir, kitin en az bir diğer parçası, burada tanımlandığı gibi en az bir başka bileşen içerebilir, kitin en az bir diğer parçası, buluşa ait farmasötik kompozisyonun veya aşının en az bir bileşenini veya buluşa ait
- 25

farmasötik kompozisyonu veya aşırı bütün halinde içerebilir ve kitin en az bir diğer parçası, örn. en az bir farmasötik taşıyıcı veya araç, vb. içerebilir. Kit veya parça kiti, birçok nükleik asit sekansı içerdiğinden kitin bir bileşeni, kit içinde bulunan nükleik asit sekanslarının sadece
5 birini, birden fazlasını veya tamamını içerebilir. Alternatif bir düzende nükleik asit sekanslarını her biri/tamamı, her bileşen kitin bir parçasını oluşturacak şekilde kitin farklı/ayrı bir bileşeni içinde bulunabilir. Ayrıca birden fazla nükleik asit, kitin parçası olarak bir birinci bileşen içinde bulunabilirken bir veya daha fazla başka (ikinci,
10 üçüncü, vb.) bileşen (kitin bileşen başka parçasını sağlar), bir veya birden fazla nükleik asit ihtiva edebilir, bunlar ise birinci bileşenle aynı veya kısmen aynı veya bundan farklı olabilir. Kit veya parça kiti ayrıca buluşa ait nükleik asit sekansının, buluşa ait farmasötik kompozisyonun veya buluşa ait aşının veya örn. kit, bir parça kiti
15 halinde hazırlanmış ise bunun bileşenlerinden veya parçalarından birinin uygulaması ve dozajı ile ilgili bilgilerle teknik talimatlar ihtiva edebilir.

Kompozisyon ayrıca burada tanımlandığı gibi farmasötik açıdan kabul
20 edilebilir bir taşıyıcı ve/veya farmasötik açıdan kabul edilebilir adjuvanlar içerebilir. Kompozisyon, kanser veya tümörle bağlantılı bir hastalığın tedavisi için veya bir aşı olarak kullanılabilir.

Diğer yönlerde buluş, SEK.KİM.NO: 57 ve SEK.KİM.NO: 58'den
25 oluşan gruptan seçilen bir nükleik asit ve adı geçen nükleik asidi içeren farmasötik bir kompozisyon ile ilgilidir. Nükleik asit ve farmasötik kompozisyonun, kanserin veya tümör hastalıklarının, özellikle akciğer kanserinin, tercihen küçük hücreli olmayan akciğer

kanserinin tedavisinde kullanılması öngörülür. Mevcut buluşta aksi belirtilmemişse alternatiflerin ve düzeneklerin farklı özellikleri birbirleri ile birleştirilebilir. Ek olarak "içerir" terimi, spesifik olarak belirtilmemişse "...dan oluşur" anlamında yorumlanmayacaktır.

- 5 Bununla birlikte mevcut buluş bağlamında "içerir" terimi, uygun durumlarda "...dan oluşur" terimi ile değiştirilebilir.

Şekiller:

- 10 Aşağıdaki Şekiller, buluşu daha fazla açıklama amaçlıdır ve mevcut buluşu bunlarla sınırlayacak şekilde yorumlanmayacaktır.

Şekil 1:

metazoan ve protozoan sap ilmik sekanslarından üretilen histon sap-
ilmiği konsensus sekansını gösterir (Dávila López, M., & Samuelsson,

- 15 T. (2008), RNA (New York, N.Y.), 14(1), 1-10.

doi:10.1261/rna.782308 tarafından bildirilmiştir). Metazoa ve
protozoadan 4001 histon sap-ilmiği sekansı hizalandı ve meydana
gelen nükleotitlerin miktarı, sap-ilmik sekansındaki her pozisyon için
gösterilmiştir. Analiz edilen sekanslarda bulunan tüm nükleotitleri

- 20 temsil eden, üretilen konsensus sekansı, tek harfli nükleotit kodu
kullanılarak verilir. Konsensus sekansına ek olarak analiz edilen
sekanslarda bulunan nükleotitlerin en az %99, %95 ve %90'ını temsil
eden sekanslar gösterilir.

Şekil 2:

- 25 protozoan sap ilmik sekanslarından üretilen histon sap-ilmiği
konsensus sekansını gösterir (Dávila López, M., & Samuelsson, T.
(2008), RNA (New York, N.Y.), 14(1), 1-10. doi:10.1261/rna.782308
tarafından bildirilmiştir). Protozoadan 131 histon sap-ilmiği sekansı

hizalandı ve meydana gelen nükleotitlerin miktarı, sap-ilmik sekansındaki her pozisyon için gösterilmiştir. Analiz edilen sekanslarda bulunan tüm nükleotitleri temsil eden, üretilen konsensus sekansı, tek harfli nükleotit kodu kullanılarak verilir. Konsensus sekansına ek olarak analiz edilen sekanslarda bulunan nükleotitlerin en az %99, %95 ve %90'ını temsil eden sekanslar gösterilir.

Şekil 3:

metazoan sap ilmik sekanslarından üretilen histon sap-ilmği konsensus sekansını gösterir (Dávila López, M., & Samuelsson, T. (2008), RNA (New York, N.Y.), 14(1), 1-10. doi:10.1261/rna.782308 tarafından bildirilmiştir). Metazoadan 3870 histon sap-ilmği sekansı hizalandı ve meydana gelen nükleotitlerin miktarı, sap-ilmik sekansındaki her pozisyon için gösterilmiştir. Analiz edilen sekanslarda bulunan tüm nükleotitleri temsil eden, üretilen konsensus sekansı, tek harfli nükleotit kodu kullanılarak verilir. Konsensus sekansına ek olarak analiz edilen sekanslarda bulunan nükleotitlerin en az %99, %95 ve %90'ını temsil eden sekanslar gösterilir.

Şekil 4:

omurgalı sap ilmik sekanslarından üretilen histon sap-ilmği konsensus sekansını gösterir (Dávila López, M., & Samuelsson, T. (2008), RNA (New York, N.Y.), 14(1), 1-10. doi:10.1261/rna.782308 tarafından bildirilmiştir). Omurgalılarından 1333 histon sap-ilmği sekansı hizalandı ve meydana gelen nükleotitlerin miktarı, sap-ilmik sekansındaki her pozisyon için gösterilmiştir. Analiz edilen sekanslarda bulunan tüm nükleotitleri temsil eden, üretilen konsensus sekansı, tek harfli nükleotit kodu kullanılarak verilir. Konsensus sekansına ek olarak analiz edilen sekanslarda bulunan nükleotitlerin en az %99, %95 ve %90'ını temsil eden sekanslar gösterilir.

Şekil 5:

insan (*Homo sapiens*) sap-ilmik sekanslarından üretilen histon sap-ilmîği konsensus sekansını gösterir (Dávila López, M., & Samuelsson, T. (2008), *RNA* (New York, N.Y.), 14(1), 1-10. doi:10.1261/rna.782308 tarafından bildirilmiştir). İnsanlardan 84 histon sap-ilmîği sekansı hizalandı ve meydana gelen nükleotitlerin miktarı, sap-ilmik sekansındaki her pozisyon için gösterilmiştir. Analiz edilen sekanslarda bulunan tüm nükleotitleri temsil eden, üretilen konsensus sekansı, tek harfli nükleotit kodu kullanılarak verilir. Konsensus sekansına ek olarak analiz edilen sekanslarda bulunan nükleotitlerin en az %99, %95 ve %90'ını temsil eden sekanslar gösterilir.

Şekiller 6 ila 21:

in vitro transkripsiyondan mRNA'ları gösterir. *İn vitro* transkripsiyon yoluyla elde edilen mRNA'ların tanımı ve sekansı verilir. Aşağıdaki kısaltmalar kullanılmıştır:

- ppLuc (GC): *Photinus pyralis* lusiferaz için kodlama yapan GC açısından zengin mRNA sekansı
- ag: alfa globin geninin 3' translasyon yapılmamış bölgesi (UTR)
- A64: 64 adenilatlı poli(A) sekansı
- A120: 120 adenilatlı poli(A) sekansı
- histoneSL: histon sap-ilmîği
- aCPSL: α CP-2KL proteinini spesifik bağlamasına göre bir kütüphaneden seçilmiş sap-ilmik
- PolioCL: Polio virüsü genomik RNA'dan 5' yonca yaprağı
- G30: 30 guanilatlı poli(G) sekansı
- U30: 30 üridilatlı poli(U) sekansı
- SL: spesifik olmayan/suni sap-ilmik

N32: 32 nükleotitlik spesifik olmayan sekans

NY-ESO-1 (G/C): insan tümör antijeni NY-ESO-1 için kodlama yapan, GC açısından zengin mRNA sekansı

Survivin(G/C): insan tümör antijeni Survivin için kodlama yapan, GC
5 açısından zengin mRNA sekansı

MAGE-C1(G/C): insan tümör antijeni MAGE-C1 için kodlama yapan, GC açısından zengin mRNA sekansı Sekanslar içinde şu elemanlar vurgulanmıştır: kodlama bölgesi (ORF) (büyük harfler), ag (kalın), histoneSL (altı çizili), test edilen diğer ayrı sekanslar (italik).

10 **Şekil 6:**

ppLuc(GC) - ag'nin (SEK.KİM.NO: 43) mRNA sekansını gösterir. Alfa-globin 3'-UTR (ag)'yi hemen takip eden kısıtlama sahasında orijinal vektörün lineer hale getirilmesi suretiyle, bir poli(A) sekansı taşımayan mRNA elde edilir.

15 **Şekil 7:**

ppLuc(GC) - ag - A64'ün (SEK.KİM.NO: 44) mRNA sekansını gösterir. A64 poli(A) sekansını hemen takip eden kısıtlama sahasında orijinal vektörün lineer hale getirilmesi suretiyle, bir A64 poli(A) sekansı ile biten mRNA elde edilir.

20 **Şekil 8:**

ppLuc(GC) - ag - histonSL'nin (SEK.KİM.NO: 45) mRNA sekansını gösterir. A64 poli(A) sekansı, bir histonSL ile değiştirildi. Örneklerde kullanılan histon sap-ilmği sekansı, Cakmakci ve arkadaşları (2008). Molecular and Cellular Biology, 28(3), 1182-1194'ten elde edildi.

25 **Şekil 9:**

ppLuc(GC) - ag - A64 - histonSL'nin (SEK.KİM.NO: 46) mRNA sekansını gösterir.

HistonSL, A64 poli(A)'nın 3' 'üne eklendi.

Şekil 10:

ppLuc(GC) - ag - A120'nin (SEK.KİM.NO: 47) mRNA sekansını gösterir. A64 poli(A) sekansı, bir A120 poli(A) sekansı ile değiştirildi.

Şekil 11:

- 5 ppLuc(GC) - ag - A64 - ag'nin (SEK.KİM.NO: 48) mRNA sekansını gösterir. Bir ikinci alfa-globin 3'-UTR, A64 poli(A)'nın 3' 'üne eklendi.

Şekil 12:

- 10 ppLuc(GC) - ag - A64 - aCPSL'nin (SEK.KİM.NO: 49) mRNA sekansını gösterir.

- Bir sap ılmik, A64 poli(A)'nın 3' 'üne eklendi. Sap ılmik, α CP-2KL proteinini spesifik bağlaması açısından bir kütüphaneden seçildi (Thisted ve arkadaşları, (2001), The Journal of Biological Chemistry, 276(20), 17484-17496). α CP-2KL, en güçlü şekilde eksprese edilen
- 15 α CP proteini (alfa-globin mRNA poli(C) bağlama proteini) olan α CP-2'nin bir izoformu (Makeyev ve arkadaşları, (2000), Genomics, 67(3), 301-316) olup, bu ise alfa-globin 3'-UTR'ye bağlanan bir grup RNA bağlama proteinidir (Chkheidze ve arkadaşları, (1999), Molecular and Cellular Biology, 19(7), 4572-4581).

Şekil 13:

20 ppLuc(GC) - ag - A64 - PolioCL'nin (SEK.KİM.NO: 50) mRNA sekansını gösterir.

Polio virüsü genomik RNA'dan 5' yonca yaprağı, A64 poli(A)'nın 3' 'üne eklendi.

Şekil 14:

25 ppLuc(GC) - ag - A64 - G30'un (SEK.KİM.NO: 51) mRNA sekansını gösterir. 30 guanilatlık bir küme, A64 poli(A)'nın 3' 'üne eklendi.

Şekil 15:

ppLuc(GC) - ag - A64 - U30'un (SEK.KİM.NO: 52) mRNA sekansını gösterir. 30 üridilatlık bir küme, A64 poli(A)'nın 3' 'üne eklendi.

Şekil 16:

ppLuc(GC) - ag - A64 - SL'nin (SEK.KİM.NO: 53) mRNA sekansını gösterir. Bir sap ilmik, A64 poli(A)'nın 3' 'üne eklendi. Sap ve ilmiğin üst bölümü, (Babendure ve arkadaşları, (2006), RNA (New York, N.Y.), 12(5), 851-861)'den alındı. Sap ilmik, CG açısından zengin, 17 baz çifti uzunluğunda bir saptan ve 6 baz uzunluğunda bir ilmikten oluşur.

10 **Şekil 17:**

ppLuc(GC) - ag - A64 - N32'yi (SEK.KİM.NO: 54) gösterir Alternatif bir kısıtlama sahasında orijinal vektörün lineer haline getirilmesi suretiyle poli(A)'yı takiben 32 ilave nükleotit ile mRNA elde edilir.

15 **Şekil 18:**

NY-ESO-1(GC) - ag - A64 - C30'un (SEK.KİM.NO: 55) mRNA sekansını gösterir.

Şekil 19:

20 NY-ESO-1(GC) - ag - A64 - C30 - histonSL'nin (SEK.KİM.NO: 56) mRNA sekansını gösterir.

Şekil 20:

Survivin(GC) - ag - A64 - C30 - histonSL'nin (SEK.KİM.NO: 57) mRNA sekansını gösterir.

Şekil 21:

25 MAGE-C1(GC) - ag - A64 - C30 - histonSL'nin (SEK.KİM.NO: 58) mRNA sekansını gösterir.

Şekil 22:

poli(A) ve histonSL kombinasyonunun, mRNA'dan protein ekspresyonunu sinerjistik şekilde arttırdığını gösterir. Poli(A) sekansı, histonSL ve poli(A) ile histonSL kombinasyonunun mRNA'dan lusiferaz ekspresyonu üzerindeki etkisi incelendi. Bu şekilde farklı mRNA'lar, HeLa hücreleri içine elektropore edildi. Lusiferaz düzeyleri, transfeksiyondan 6, 24 ve 48 saat sonra ölçüldü. Poli(A) sekansı veya histonSL içermeyen mRNA'dan az miktarda lusiferaz eksprese edilir. Bir poli(A) sekansı veya histonSL, lusiferaz düzeyini artırır. Bununla birlikte çarpıcı şekilde poli(A) ve histonSL kombinasyonu, tek tek elemanların herhangi biri ile gözlemlenen düzeyin birkaç kat üzerinde lusiferaz düzeyini güçlü şekilde arttırarak böylelikle sinerjistik tesir gösterir. Veriler, üç tekrarlı transfeksiyonlar için ortalama RLU $\pm$ SD (nispi ışık ünitesi $\pm$ standart sapma) cinsinden grafikte gösterilir. Spesifik RLU, Örnek 14.2'de

15 özetlenmiştir.

Şekil 23:

poli(A) ve histonSL kombinasyonunun, sıralarına bakılmaksızın mRNA'dan protein ekspresyonunu arttırdığını gösterir. Poli(A) sekansı, histonSL, poli(A) ile histonSL kombinasyonu ve bunların sırasının mRNA'dan lusiferaz ekspresyonu üzerindeki etkisi incelendi. Bu şekilde farklı mRNA'lar, HeLa hücreleri içine lipofekte edildi. Lusiferaz düzeyleri, transfeksiyon başladıktan 6, 24 ve 48 saat sonra ölçüldü. Bir A64 poli(A) sekansı veya histonSL, denk lusiferaz düzeylerine yol açar. Poli(A) sekansının uzunluğunun A64'ten

20 A120'ye veya A300'e çıkarılması, lusiferaz düzeyini mutedil şekilde artırır. Buna karşılık poli(A) ve histonSL kombinasyonu, lusiferaz düzeyini, poli(A) sekansının uzatılmasından çok daha fazla artırır. Poli(A) ve histonSL kombinasyonu, sinerjistik şekilde tesir gösterir,

25

çünkü tek tek elemanların herhangi biri ile gözlemlenen düzeyin birkaç kat üzerinde lusiferaz düzeyini arttırır. Poli(A) ile histonSL kombinasyonunun sinerjistik etkisi, poli(A) ve histonSL sırasından bağımsız olarak ve A64-histonSL veya histonSL-A250 mRNA ile poli(A) uzunluğundan bağımsız olarak görülür. Veriler, üç tekrarlı transfeksiyonlar için ortalama RLU $\pm$ SD cinsinden grafikte gösterilir. Spesifik RLU, Örnek 14.3'te özetlenmiştir.

Şekil 24:

poli(A) ile histonSL kombinasyonu tarafından protein ekspresyonundaki artışın spesifik olduğunu gösterir. Poli(A) ile histonSL'nin veya poli (A) ile alternatif sekansların birleştirilmesinin, mRNA'dan lusiferaz ekspresyonu üzerindeki etkisi incelendi. Bu şekilde farklı mRNA'lar, HeLa hücreleri içine elektropore edildi. Lusiferaz düzeyleri, transfeksiyondan 6, 24 ve 48 saat sonra ölçüldü. Bir poli(A) sekansı veya histonSL, denk lusiferaz düzeylerine yol açar. Poli(A) ve histonSL kombinasyonu, tek tek elemanların herhangi biri ile gözlemlenen düzeyin birkaç kat üzerinde lusiferaz düzeyini güçlü şekilde arttırarak böylelikle sinerjistik tesir gösterir. Buna karşılık poli(A)'nın başka bir sekans ile birleştirilmesi, sadece bir poli(A) sekansı ihtiva eden mRNA'ya kıyasla lusiferaz düzeyi üzerinde etkisizdir. Böylelikle poli(A) ile histonSL kombinasyonu, spesifik ve sinerjistik şekilde tesir gösterir. Veriler, üç tekrarlı transfeksiyonlar için ortalama RLU $\pm$ SD cinsinden grafikte gösterilir. Spesifik RLU, Örnek 14.4'te özetlenmiştir.

Şekil 25:

poli(A) ve histonSL kombinasyonunun, mRNA'dan protein ekspresyonunu in vivo sinerjistik şekilde arttırdığını gösterir. Poli(A) sekansı, histonSL ve poli(A) ile histonSL kombinasyonunun

in vivo mRNA'dan lusiferaz ekspresyonu üzerindeki etkisi incelendi. Bu şekilde farklı mRNA'lar, farelere intradermal yoldan enjekte edildi. Enjeksiyondan 16 saat sonra fareler öldürüldü ve enjeksiyon sahalarında Lusiferaz düzeyleri ölçüldü. Lusiferaz, bir histonSL'ye veya bir poli(A) sekansına sahip mRNA'dan eksprese edilir. Bununla birlikte çarpıcı şekilde poli(A) ve histonSL kombinasyonu, tek tek elemanların herhangi biri ile gözlemlenen düzeyin birkaç kat üzerinde lusiferaz düzeyini güçlü şekilde arttırarak böylelikle sinerjistik tesir gösterir. Veriler, ortalama RLU $\pm$ SEM (nispi ışık ünitesi $\pm$ standart ortalama hatası) cinsinden grafikte gösterilir. Spesifik RLU, Örnek 14.5'te özetlenmiştir.

Şekil 26:

poli(A) ve histonSL kombinasyonunun, mRNA'dan NY-ESO-1 protein ekspresyonunu arttırdığını gösterir.

Poli(A) sekansı, histonSL ve poli(A) ile histonSL kombinasyonunun mRNA'dan NY-ESO-1 ekspresyonu üzerindeki etkisi incelendi. Bu şekilde farklı mRNA'lar, HeLa hücreleri içine elektropore edildi. NY-ESO-1 düzeyleri, transfeksiyondan 24 saat sonra akış sitometresi ile ölçüldü. NY-ESO-1, sadece bir poli(A) sekansına sahip mRNA'dan eksprese edilir. Bununla birlikte çarpıcı şekilde poli(A) ve histonSL kombinasyonu, sadece bir poli(A) sekansı ile gözlemlenen düzeyin birkaç kat üzerinde NY-ESO-1 düzeyini güçlü şekilde arttırır. Veriler, flüoresan yoğunluğuna karşı sayımlar halinde grafikte gösterilir. Medyan flüoresan yoğunlukları (MFI), Örnek 14.6'da özetlenmiştir.

Şekil 27:

poli(A) ve histonSL kombinasyonunun, mRNA ile aşılama yoluyla uyandırılan antikör düzeyini arttırdığını gösterir.

Poli(A) sekansı ve poli(A) ile histonSL kombinasyonunun, mRNA ile aşılama yoluyla uyandırılan anti NY-ESO-1 antikorlarının indüklenmesi üzerindeki etkisi incelendi. Bu nedenle C57BL/6 fareleri, protamin ile kompleksleştirilmiş farklı mRNA'lar ile intradermal yoldan aşılandı. Aşılanmış farelerde ve kontrol farelerinde NY-ESO-1'e spesifik antikorların düzeyi, seri serum seyreltileri ile ELISA ile analiz edildi. Anti NY-ESO-1 IgG2a[b], sadece bir poli(A) sekansına sahip mRNA tarafından indüklenir. Bununla birlikte çarpıcı şekilde poli(A) ve histonSL kombinasyonu, sadece bir poli(A) sekansı ile gözlemlenen düzeyin birkaç kat üzerinde anti NY-ESO-1 IgG2a[b] düzeyini güçlü şekilde artırır. Veriler, ortalama uç nokta titerleri halinde grafikte gösterilir. Ortalama uç nokta titerleri, Örnek 14.7'de özetlenmiştir.

15 **Örnekler:**

Aşağıdaki Örnekler, buluşu daha fazla açıklama amaçlıdır ve mevcut buluşu bunlarla sınırlayacak şekilde yorumlanmayacaktır.

20 **1. Histon sap-ilmiği konsensus sekanslarının üretilmesi**

Deneylerden önce histon sap-ilmiği konsensus sekansları, metazoan ve protozoan histon sap-ilmiği sekansları bazında belirlendi. Sekanslar, genomik sekansları ve eksprese edilen sekans takılarını araştırarak çok sayıda doğal histon sap-ilmiği sekansını tanımlamış bulunan Lopez ve arkadaşları (Dávila López, M., & Samuelsson, T. (2008), RNA (New York, N.Y.), 14(1), 1-10. doi:10.1261/rna.782308) tarafından sağlanan ekten alındı. İlk olarak metazoa ve protozoadan

tüm sekanslar (4001 sekans) veya protozoadan (131 sekans) veya alternatif olarak metazoadan (3870 sekans) veya omurgalılarından (1333 sekans) veya insanlardan (84 sekans) tüm sekanslar gruplandı ve hizalandı. Sonra her pozisyon için meydana gelen nükleotitlerin miktarı belirlendi. Bu şekilde elde edilen tablolara dayanarak 5 farklı sekans grubu için, analiz edilen sekanslarda bulunan tüm nükleotitleri temsil eden konsensus sekansları oluşturuldu. Ek olarak konserve edilmiş nükleotitler giderek artan şekilde vurgulanarak daha kısıtlayıcı konsensus sekansları da elde edildi.

10

2. DNA şablonlarının preparasyonu

Bir T7 promoteri, ardından Photinus pyralis lusiferaz (ppLuc(GC)) için kodlama yapan, GC açısından zengin bir sekans, alfa-globin (ag)'nin 3' translasyon yapılmamış bölgesinin (UTR) orta kısmı ve bir poli(A) sekansı ihtiva eden bir vektör, in vitro transkripsiyon için yapılandırıldı. Bir A64 poli(A) sekansı ile biten mRNA elde etmek için in vitro transkripsiyondan önce vektörün lineer hale getirilmesinde kullanılan bir kısıtlama sahası, poli(A) sekansını takip ediyordu. Buna göre in vitro transkripsiyon yoluyla bu vektörden elde edilen mRNA, "ppLuc(GC) - ag - A64" olarak adlandırılır.

Bu vektörün alternatif kısıtlama sahalarında, in vitro transkripsiyon öncesinde lineer hale getirilmesi, A64'ün 3' 'ünde ilave nükleotitler ile uzatılmış veya A64 taşımayan mRNA elde edilmesini sağladı. Ek olarak orijinal vektör, alternatif sekanslar içerecek şekilde modifiye edildi. Özet olarak bu vektörlerden in vitro transkripsiyon yoluyla

25

aşağıdaki mRNA'lar elde edildi (mRNA sekansları, Şekil 6 ila 17'de verilmiştir):

- ppLuc(GC) - ag (SEK.KİM.NO: 43)
- ppLuc(GC) - ag - A64 (SEK.KİM.NO: 44)
- 5 ppLuc(GC) - ag - histonSL (SEK.KİM.NO: 45)
- ppLuc(GC) - ag - A64 - histonSL (SEK.KİM.NO: 46)
- ppLuc(GC) - ag - A120 (SEK.KİM.NO: 47)
- ppLuc(GC) - ag - A64 - ag (SEK.KİM.NO: 48)
- ppLuc(GC) - ag - A64 - aCPSL (SEK.KİM.NO: 49)
- 10 ppLuc(GC) - ag - A64 - PolioCL (SEK.KİM.NO: 50)
- ppLuc(GC) - ag - A64 - G30 (SEK.KİM.NO: 51)
- ppLuc(GC) - ag - A64 - U30 (SEK.KİM.NO: 52)
- ppLuc(GC) - ag - A64 - SL (SEK.KİM.NO: 53)
- ppLuc(GC) - ag - A64 - N32 (SEK.KİM.NO: 54)

15

Ek olarak NY-ESO-1, Survivin ve MAGE-C1 tümör antijenleri için kodlama yapan DNA plazmid sekansları, buna göre yukarıda tarif edildiği gibi hazırlandı.

- 20 Özet olarak bu vektörlerden in vitro transkripsiyon yoluyla aşağıdaki mRNA'lar elde edildi (mRNA sekansları, Şekil 18 ila 21'de verilmiştir):

- NY-ESO-1(GC) - ag - A62 - C30 (SEK.KİM.NO: 55)
- NY-ESO-1(GC) - ag - A62 - C30 - histonSL (SEK.KİM.NO: 56)
- 25 Survivin(GC) - ag - A62 - C30 - histonSL (SEK.KİM.NO: 57)
- MAGE-C1(GC) - ag - A64 - C30 - histonSL (SEK.KİM.NO: 58)

3. İn vitro transkripsiyon

Ornek 2'ye göre DNA şablonu, lineer hale getirildi ve T7-Polimeraz kullanılarak in vitro transkripte edildi. Daha sonra DNA şablonu, DNaz işlemi ile sindirildi. Tüm mRNA transkriptleri, transkripsiyon reaksiyonuna fazla N7-Metil-Guanosin-5'-Trifosfat-5'-Guanosin ilave edilerek elde edilmiş bir 5'-CAP yapısı ihtiva ediyordu. Bu şekilde elde edilen mRNA, saflaştırıldı ve su içinde yeniden süspanse edildi.

4. mRNA'nın enzimatik adenilasyonu

İki mRNA, enzimatik şekilde adenile edildi:

ppLuc(GC) - ag - A64 ve ppLuc(GC) - ag - histonSL.

Bu amaçla RNA, E. coli Poli(A)-polimeraz ve ATP (Poli(A) Polimeraz Kuyruk Kiti, Epicentre, Madison, ABD) ile üreticinin talimatları uygulanarak inkübe edildi. Uzatılmış poli(A) sekansı ile mRNA, saflaştırıldı ve su içinde yeniden süspanse edildi. Poli(A) sekansının uzunluğu, agaroz jel elektroforezi yoluyla belirlendi. Başlangıç mRNA'ları, yaklaşık olarak 250 adenilat kadar uzatıldı; elde edilen mRNA'lar, sırasıyla ppLuc(GC) - ag - A300 ve ppLuc(GC) - ag - histonSL - A250 olarak adlandırıldı.

5. mRNA elektroporasyonu yoluyla lusiferaz ekspresyonu

HeLa hücreleri, tripsinize edildi ve opti-MEM içinde yıkandı. 200 µl opti-MEM içinde 1×10^5 hücre, 0.5 µg ppLuc'yi şifreleyen mRNA ile

elektropore edildi. Kontrol olarak ppLuc için kodlama yapmayan mRNA, ayrıca elektropore edildi. Elektropore edilen hücreler, 1 ml RPMI 1640 ortamı içinde 24 oyuklu plakalarda tohumlandı. Transfeksiyondan 6, 24 veya 48 saat sonra ortam havalandırıldı ve
 5 hücreler, 200 µl liziz tamponu (25 mM Tris, pH 7.5 (HCl), 2 mM EDTA, %10 gliserol, %1 Triton X-100, 2 mM DTT, 1 mM PMSF) içinde lize edildi. ppLuc aktivitesi ölçülene kadar lizatlar -20°C'de saklandı.

10 6. mRNA lipofeksiyonu yoluyla lusiferaz ekspresyonu

HeLa hücreleri, oyuk başına 2×10^4 hücre yoğunluğunda 96 oyuklu plakalarda tohumlandı. Ertesi gün hücreler, opti-MEM içinde yıkandı ve sonra 0.25 µg Lipofektin ile kompleksleştirilmiş, ppLuc'yi
 15 şifreleyen mRNA ile 150 µl opti-MEM içinde transfekte edildi. Kontrol olarak ppLuc için kodlama yapmayan mRNA, ayrıca lipofekte edildi. Bazı oyuklarda transfeksiyon başladıktan 6 saat sonra opti-MEM havalandırıldı ve hücreler, 200 µl liziz tamponu içinde lize edildi. Geri kalan oyuklarda bu zamanda opti-MEM, RPMI 1640 ile
 20 değiştirildi. Bu oyuklarda transfeksiyon başladıktan 24 veya 48 saat sonra ortam havalandırıldı ve hücreler, 200 µl liziz tamponu içinde lize edildi. ppLuc aktivitesi ölçülene kadar lizatlar -20°C'de saklandı.

7. Lusiferaz ölçümü

25

ppLuc aktivitesi, nispi ışık üniteleri (RLU) cinsinden, bir BioTek SynergyHT plaka okuyucuda, 5 saniye ölçüm süresinde, 50 µl lizat ve 200 µl lusiferin tamponu (25 mM Glisilglisin, pH 7.8 (NaOH), 15 mM

MgSO₄, 2 mM ATP, 75 µM lusiferin) kullanılarak ölçüldü. Spesifik RLU, toplam RLU'dan kontrol RNA'ya ait RLU çıkarılarak hesaplandı.

5 **8. İntradermal mRNA enjeksiyonu yoluyla lusiferaz ekspresyonu (İn vivo lusiferaz ekspresyonu)**

Bir Rompun ve Ketavet karışımı ile farelere anestezi uygulandı. ppLuc'yi şifreleyen her mRNA, intradermal yoldan enjekte edildi (enjeksiyon başına 50 µl içinde 0.5 µg mRNA). Kontrol olarak ppLuc için kodlama yapmayan mRNA, ayrıca enjekte edildi. Enjeksiyondan 16 saat sonra fareler öldürüldü ve doku toplandı. Doku örnekleri, sıvı nitrojen içinde anında donduruldu ve bir doku lize edicide (Qiagen) 800 µl liziz tamponu (25 mM Tris, pH 7.5 (HCl), 2 mM EDTA, %10 gliserol, %1 Triton X-100, 2 mM DTT, 1 mM PMSF) içinde lize edildi. Ardından örnekler, 13500 rpm'de 4°C'de 10 dakika süreyle santrifüjlendi. ppLuc aktivitesi ölçülene kadar lizatlar -80°C'de saklandı (bakınız 7. lusiferaz ölçümü).

20 **9. mRNA elektroporasyonu yoluyla NY-ESO-1 ekspresyonu**

HeLa hücreleri, tripsinize edildi ve opti-MEM içinde yıkandı. 200 µl opti-MEM içinde 2x10⁵ hücre, 10 µg NY-ESO-1'i şifreleyen mRNA ile elektropore edildi. Elektroporasyonlardan gelen hücreler 25 birleştirildi ve 2 ml RPMI 1640 ortamı içinde 6 oyuklu bir plakada tohumlandı. Transfeksiyondan 24 saat sonra hücreler toplandı ve 96 oyuklu, V tabanlı bir plakaya aktarıldı (mRNA başına 2 oyuk). Hücreler, fosfat tamponlu tuz (PBS) ile yıkandı ve oyuk başına 200 µl

Cytofix/Cytoperm (Becton Dickinson (BD)) ile geçirgenleştirildi. 15 dakika sonra hücreler, PermWash (BD) ile yıkandı. Sonra hücreler, oda sıcaklığında 1 saat süreyle fare anti-NY-ESO-1 IgG1 veya bir izotip kontrolü (20 µg/ml) ile inkübe edildi. Hücreler tekrar iki kez
 5 PermWash ile yıkandı. Ardından hücreler, 1 saat süreyle 4°C'de, 1:500 oranında bir Alexa-647 ile birleştirilmiş keçi-anti-fare IgG seyreltisi ile inkübe edildi. Son olarak hücreler iki kez PermWash ile yıkandı. Hücreler, 200 µl tampon (PBS, %2 FCS, 2 mM EDTA, %0.01 sodyum azid) içinde yeniden süspanse edildi. NY-ESO-1
 10 ekspresyonu, medyan flürosena yoğunluğu (MFI) cinsinden akış sitometresi ile nicelendirildi.

10. Anti NY-ESO-1 antikorlarının mRNA ile aşılama yoluyla indüklenmesi

15

C57BL/6 fareleri, protamin ile kompleksleştirilmiş, NY-ESO-1'i şifreleyen mRNA ile intradermal yoldan aşılandı (14 günde 5 kez). Kontrol fareleri, tampon ile işleme tabi tutuldu. Aşılanmış farelerde ve kontrol farelerinde NY-ESO-1'e spesifik antikorların düzeyi, ELISA
 20 ile son aşılamaadan 8 gün sonra analiz edildi: 96 oyuklu ELISA plakaları (Nunc), oyuk başına 100 µl 10 µg/ml rekombinant NY-ESO-1 proteini ile 16 saat süreyle 4°C'de kaplandı. Plakalar, iki kez yıkama tamponu (PBS, %0.05 Tween-20) ile yıkandı. Spesifik olmayan bağlanmayı bloke etmek için daha sonra plakalar, 2 saat süreyle
 25 37°C'de bloklama tamponu (PBS, %0.05 Tween-20, %1 BSA) ile inkübe edildi. Bloklamadan sonra oyuk başına 100 µl seri seyreltilmiş fare serumları ilave edildi ve oda sıcaklığında 4 saat süreyle inkübe edildi. Plakalar daha sonra üç kez yıkama tamponu ile yıkandı.

Ardından oyuk başına 100 µl biyotinile edilmiş sıçan anti-fare IgG2a[b] saptama antikoru (BD Biosciences), bloklama tamponu içinde 1:600 oranında seyreltilmiş olarak, 1 saat süreyle oda sıcaklığında bağlanmaya bırakıldı. Plakalar tekrar üç kez yıkama
 5 tamponu ile yıkandı, ardından 30 dakika süreyle oda sıcaklığında oyuk başına 100 µl yabancıturpu peroksidaz ile birleştirilmiş streptavidin ile inkübe edildi. Yıkama tamponu ile dört yıkamadan sonra oyuk başına 100 µl 3,3',5,5'-tetrametilbenzidin (Thermo Scientific) ilave edildi. Renkte değişim meydana gelmesi üzerine oyuk başına 100 µl %20
 10 sülfürik asit ilave edildi. 405 nm'de absorbans ölçüldü.

11. Anti Survivin antikorlarının mRNA ile aşılama yoluyla indüklenmesi

15 C57BL/6 fareleri, protamin ile kompleksleştirilmiş, Survivini şifreleyen mRNA ile intradermal yoldan aşılandı (14 günde 5 kez). Kontrol fareleri, tampon ile işleme tabi tutuldu. Aşılanmış farelerde ve kontrol farelerinde Survivine spesifik antikörlerin düzeyi, ELISA ile son aşılamadan 8 gün sonra analiz edildi: 96 oyuklu ELISA plakaları
 20 (Nunc), oyuk başına 100 µl 10 µg/ml rekombinant Survivin proteini ile 16 saat süreyle 4°C'de kaplandı. Plakalar, iki kez yıkama tamponu (PBS, %0.05 Tween-20) ile yıkandı. Spesifik olmayan bağlanmayı bloke etmek için daha sonra plakalar, 2 saat süreyle 37°C'de bloklama tamponu (PBS, %0.05 Tween-20, %1 BSA) ile inkübe edildi.
 25 Bloklamadan sonra oyuk başına 100 µl seri seyreltilmiş fare serumları ilave edildi ve oda sıcaklığında 4 saat süreyle inkübe edildi. Plakalar daha sonra üç kez yıkama tamponu ile yıkandı. Ardından oyuk başına 100 µl biyotinile edilmiş sıçan anti-fare IgG2a[b] saptama antikoru

(BD Biosciences), bloklama tamponu içinde 1:600 oranında seyreltilmiş olarak, 1 saat süreyle oda sıcaklığında bağlanmaya bırakıldı. Plakalar tekrar üç kez yıkama tamponu ile yıkandı, ardından 30 dakika süreyle oda sıcaklığında oyuk başına 100 µl yabancıturpu peroksidaz ile birleştirilmiş streptavidin ile inkübe edildi. Yıkama 5 tamponu ile dört yıkamadan sonra oyuk başına 100 µl 3,3',5,5'-tetrametilbenzidin (Thermo Scientific) ilave edildi. Renkte değişim meydana gelmesi üzerine oyuk başına 100 µl %20 sülfürik asit ilave edildi. 405 nm'de absorban ölçüldü.

10

12. Anti MAGE-C1 antikorlarının mRNA ile aşılama yoluyla indüklenmesi

C57BL/6 fareleri, protamin ile kompleksleştirilmiş, MAGE-C1'i 15 şifreleyen mRNA ile intradermal yoldan aşılandı (14 günde 5 kez). Kontrol fareleri, tampon ile işleme tabi tutuldu. Aşılanmış farelerde ve kontrol farelerinde MAGE-C1'e spesifik antikorların düzeyi, ELISA ile son aşılamadan 8 gün sonra analiz edildi: 96 oyuklu ELISA plakaları (Nunc), oyuk başına 100 µl 10 µg/ml rekombinant MAGE- 20 C1 proteini ile 16 saat süreyle 4°C'de kaplandı. Plakalar, iki kez yıkama tamponu (PBS, %0.05 Tween-20) ile yıkandı. Spesifik olmayan bağlanmayı bloke etmek için daha sonra plakalar, 2 saat süreyle 37°C'de bloklama tamponu (PBS, %0.05 Tween-20, %1 BSA) ile inkübe edildi. Bloklamadan sonra oyuk başına 100 µl seri 25 seyreltilmiş fare serumları ilave edildi ve oda sıcaklığında 4 saat süreyle inkübe edildi. Plakalar daha sonra üç kez yıkama tamponu ile yıkandı. Ardından oyuk başına 100 µl biyotinile edilmiş sıçan anti-fare IgG2a[b] saptama antikor (BD Biosciences), bloklama tamponu

5 içinde 1:600 oranında seyreltilmiş olarak, 1 saat süreyle oda sıcaklığında bağlanmaya bırakıldı. Plakalar tekrar üç kez yıkama tamponu ile yıkandı, ardından 30 dakika süreyle oda sıcaklığında oyuk başına 100 µl yabanturpu peroksidaz ile birleştirilmiş streptavidin ile
 5 inkübe edildi. Yıkama tamponu ile dört yıkamadan sonra oyuk başına 100 µl 3,3',5,5'-tetrametilbenzidin (Thermo Scientific) ilave edildi. Renkte değişim meydana gelmesi üzerine oyuk başına 100 µl %20 sülfürik asit ilave edildi. 405 nm'de absorbans ölçüldü.

10 **13. Antijene spesifik hücresel immün tepkisinin (T hücresi immün tepkisinin) ELISPOT ile saptanması:**

C57BL/6 fareleri, protamin ile kompleksleştirilmiş, MAGE-C1'i şifreleyen mRNA ile intradermal yoldan aşılanır (14 günde 5 kez).
 15 Kontrol fareleri, tampon ile işleme tabi tutulur. Son aşılamadan 1 hafta sonra fareler öldürülür, dalaklar çıkarılır ve splenositler izole edilir. Splenositler, yukarıdaki antijenden (peptit kütüphanesi) alınan peptitler varlığında 7 gün süreyle yeniden uyarılır veya doğal singeneik farelerin kemik iliği hücrelerinden üretilen ve antijen için
 20 kodlama yapan RNA ile elektroporasyon yapılan dendritik hücreler ile birlikte inkübe edilir. Antijene spesifik hücresel immün tepkisini belirlemek için IFNgamma sekresyonu, yeniden uyarma sonrasında ölçüldü. IFNgamma saptaması için kılıflı bir çok perdeli plaka (Millipore), bir gece süreyle IFNγ'ye yönelik antikor (BD
 25 Pharmingen, Heidelberg, Almanya) içeren kaplama tamponu 0.1 M karbonat-bikarbonat tamponu pH 9.6, 10.59 g/l Na₂CO₃, 8.4g/l NaHCO₃) ile inkübe edilir. Uyarıcılar ve efektör hücreler, plakada 1:20 oranında 24 saat süreyle birlikte inkübe edilir. Plaka, 1×PBS ile

yıkanır ve biyotin ile birleştirilmiş ikincil antikor ile inkübe edilir. 1xPBS/%0.05 Tween-20 ile yıkandıktan sonra substrat (5-Bromo-4-Kloro-3-İndolil Fosfat/Nitro Blue Tetrazolyum Sıvı Substrat Sistemi, Sigma Aldrich, Taufkirchen, Almanya'dan) plakaya ilave edilir ve
5 substrat dönüşümü gözle saptanabilir.

14. SONUÇLAR

14.1 Histon sap-ilmîği sekansları:

10

Histon sap-ilmîği sekanslarını karakterize etmek için metazoa ve protozoadan (4001 sekans) veya protozoadan (131 sekans) veya alternatif olarak metazoadan (3870 sekans) veya omurgalılarından (1333 sekans) veya insanlardan (84 sekans) sekanslar gruplandı ve hizalandı.

15

Sonra her pozisyon için meydana gelen nükleotitlerin miktarı belirlendi. Bu şekilde elde edilen tablolara dayanarak 5 farklı sekans grubu için, analiz edilen sekanslarda bulunan tüm nükleotitleri temsil eden konsensus sekansları oluşturuldu. Metazoa ve protozoa'nın birleştirilmiş konsensus sekansı içinde 3 nükleotit konserve edilir;

20

ilmikte bir T/U ve sapta bir G ve bir C, bu şekilde bir baz çifti oluşturulur. Yapı açısından tipik olarak 6 baz çiftlik bir sap ve 4 nükleotitlik bir ilmik oluşturulur. Bununla birlikte sapan yapılar da yaygındır: 84 insan histon sap-ilmîği arasından ikisi, 4 baz çift ve bir yanlış eşleşme içeren sadece 5 nükleotitlik bir sap ihtiva eder. Bir

25

başka insan histon sap-ilmîği, sadece 5 baz çiftlik bir sap ihtiva eder. Dört insan histon sap-ilmîği daha, 6 nükleotit uzunluğunda bir sap ihtiva eder, ancak ayrı ayrı üç farklı pozisyonda bir yanlış eşleşme içerir. Ekolarak dört insan histon sap-ilmîği, ayrı ayrı iki farklı

N*	G veya C veya T/U veya A var veya yok	Herhangi bir baz
		Baz var olabilir veya olmayabilir

14.2 Poli(A) ve histonSL kombinasyonu, mRNA'dan protein ekspresyonunu sinerjistik şekilde arttırır.

- 5 Poli(A) ile histonSL kombinasyonunun, mRNA'dan protein ekspresyonu üzerindeki etkisini araştırmak için alfa-globin 3'-UTR'nin farklı 3' sekanslarına sahip mRNA'lar sentezlendi: 3'-UTR'nin sadece 3' 'ü ile biten, bu nedenle poli(A) sekansını ve histonSL'yi taşımayan veya bir A64 poli(A) sekansı veya bir histonSL ya da 3'-UTR'nin hem
- 10 A64 poli(A) hem histonSL 3' 'ünü ihtiva eden mRNA'lar. Lusiferazı şifreleyen mRNA'lar veya kontrol mRNA, HeLa hücreleri içine elektropore edildi. Lusiferaz düzeyleri, transfeksiyondan 6, 24 ve 48 saat sonra ölçüldü (bakınız aşağıdaki Tablo 6 ve Şekil 22).

15

Tablo 6:

mRNA	6 saatte RLU	24 saatte RLU	48 saatte RLU
ppLuc(GC)-ag-A64-histonSL	466553	375169	70735
ppLuc(GC)-ag-histonSL	50947	3022	84
ppLuc(GC)-ag-A64	10471	19529	4364
ppLuc(GC)-ag	997	217	42

- Poli(A) sekansı veya histonSL içermeyen mRNA'dan az miktarda lusiferaz eksprese edildi. Bir poli(A) sekansı veya histonSL, lusiferaz
- 20 düzeyini arttırdı. Herhangi bir mRNA, hem poli(A) hem histonSL taşımayan mRNA'dan çok daha yüksek bir lusiferaz düzeyine yol açtı. Bununla birlikte çarpıcı şekilde poli(A) ve histonSL kombinasyonu, tek tek elemanların herhangi biri ile gözlemlenen düzeyin birkaç kat üzerinde lusiferaz düzeyini güçlü şekilde arttırdı. Aynı mRNA içinde

poli(A) ve histonSL'nin birleştirilmesine bağlı olarak lusiferaz düzeyinde meydana gelen artışın büyüklüğü, bunların sinerjistik şekilde tesir gösterdiğini ortaya koyar.

- 5 Poli(A) ve histonSL arasındaki sinerji, poli(A)-histonSL mRNA'dan (+/+) gelen sinyalin, histonSL mRNA'dan (-/+) ve poli(A) mRNA'dan (+/-) gelen sinyallerin toplamına bölünmesi suretiyle nicelendirildi (bakınız aşağıdaki Tablo 7).

10

Tablo 7:

	A64	histonSL	6 saatte RLU	24 saatte RLU	48 saatte RLU
	+	+	466553	375169	70735
	-	+	50947	3022	84
	+	-	10471	19529	4364
Sinerji			7.6	16.6	15.9

- Bu şekilde hesaplanan faktör, poli(A) ve histonSL'yi birleştiren mRNA'dan edinilen lusiferaz düzeyinin, poli(A) ve histonSL'nin etkileri tamamen toplamsal olsa idi beklenecek olandan ne kadar daha
- 15 yüksek olduğunu belirtir. poli(A) ve histonSL'yi birleştiren mRNA'dan edinilen lusiferaz düzeyi, bunların etkileri tamamen toplamsal olsa idi sağlanacak olan düzeyden 16.6 kata kadar daha yüksekti. Bu sonuç, poli(A) ve histonSL kombinasyonunun, protein ekspresyonunda çarpıcı şekilde sinerjistik bir artış sağladığını teyit
- 20 eder.

14.3. Poli(A) ve histonSL kombinasyonu, sıralarına bakılmaksızın mRNA'dan protein ekspresyonunu arttırır.

- 25 Poli(A) ve histonSL kombinasyonunun etkisi, poli(A) sekansının

uzunluğuna ve poli(A) ve histonSL sırasına bağlı olabilir. Bu nedenle poli(A) sekansı uzunluğunun arttırıldığı mRNA'lar ve tersine çevrilmiş sırada poli(A) ve histonSL'li mRNA sentezlendi: İki mRNA, 3'-UTR'nin 3' 'ünde bir A120 veya bir A300 poli(A) sekansı ihtiva ediyordu. Bir başka mRNA, 3'-UTR'nin 3' 'ünde ilk olarak bir histonSL, ardından bir A250 poli(A) sekansı ihtiva ediyordu. Lusiferazı şifreleyen mRNA'lar veya kontrol mRNA, HeLa hücreleri içine lipofekte edildi. Lusiferaz düzeyleri, transfeksiyon başladıktan 6, 24 ve 48 saat sonra ölçüldü (bakınız aşağıdaki Tablo 8 ve Şekil 23).

10

Tablo 8:

mRNA	6 saatte RLU	24 saatte RLU	48 saatte RLU
ppLuc(GC)-ag-histonSL-A250	98472	734222	146479
ppLuc(GC)-ag-A64-histonSL	123674	317343	89579
ppLuc(GC)-ag-histonSL	7291	4565	916
ppLuc(GC)-ag-A300	4357	38560	11829
ppLuc(GC)-ag-A120	4371	45929	10142
ppLuc(GC)-ag-A64	1928	26781	537

Bir A64 poli(A) sekansı veya histonSL, denk lusiferaz düzeylerine yol açtı.. Önceki deneye uyumlu şekilde A64 ve histonSL kombinasyonu, tek tek elemanların herhangi biri ile gözlemlenen düzeyin birkaç kat üzerinde lusiferaz düzeyini güçlü şekilde arttırır. Aynı mRNA içinde poli(A) ve histonSL'nin birleştirilmesine bağlı olarak lusiferaz düzeyinde meydana gelen artışın büyüklüğü, bunların sinerjistik şekilde tesir gösterdiğini ortaya koyar. A64 ile histonSL arasındaki sinerji, daha önceki gibi, A64-histonSL, A64 ve histonSL mRNA'nın lusiferaz düzeylerine göre nicelendirildi (bakınız aşağıdaki Tablo 9). A64 ve histonSL'yi birleştiren mRNA'dan edinilen lusiferaz düzeyi,

15

20

poli(A) ve histonSL'nin etkileri tamamen toplamsal olsa idi sağlanacak olan düzeyden 61.7 kata kadar daha yüksekti.

Tablo 9:

	A64	histonSL	6 saatte RLU	24 saatte RLU	48 saatte RLU
	+	+	123674	317343	89579
	-	+	7291	4565	916
	+	-	1928	26781	537
Sinerji			13.4	10.1	61.7

5

Buna karşılık poli(A) sekansının uzunluğunun A64'ten A120'ye veya A300'ya çıkarılması, lusiferaz düzeyini ancak mutedil düzeyde arttırdı (bakınız Tablo 8 ve Şekil 19). En uzun poli(A) sekansına sahip mRNA, A300 de benzer uzunlukta bir poli(A) sekansının, histonSL ile

10

birleştirildi mRNA, histonSL-A250'ya denkti. Uzun bir poli(A) sekansına sahip olmaya ek olarak histonSL ve poli(A) sırası, bu mRNA'da, A64-histonSL mRNA'ya göre tersine çevrildi. A250 ve histonSL kombinasyonu, histonSL veya A300'den biri ile gözlemlenen düzeyin birkaç kat üzerinde lusiferaz düzeyini güçlü şekilde arttırdı.

15

Yine A250 ile histonSL arasındaki sinerji, daha önceki gibi, histonSL-A250 mRNA'dan gelen RLU ile A300 mRNA artı histonSL mRNA'dan gelen RLU ile karşılaştırılarak nicelendirildi (bakınız aşağıdaki Tablo 10). A250 ve histonSL'yi birleştiren mRNA'dan edinilen lusiferaz düzeyi, poli(A) ve histonSL'nin etkileri tamamen

20

toplamsal olsa idi sağlanacak olan düzeyden 17.0 kata kadar daha yüksekti.

Tablo 10:

	histonSL	A250/A300	6 saatte RLU	24 saatte RLU	48 saatte RLU
	+	+	98472	734222	146479
	+	-	7291	4565	916
	-	+	4357	38560	11829
Sinerji			8.5	17.0	11.5

Ozet olarak histonSL ile poli(A) kombinasyonunun, mRNA'dan protein ekspresyonu üzerindeki yüksek oranda sinerjistik etkisi, önemli ölçüde farklı uzunluklarda poli(A) için ve poli(A) ve histonSL sırasından bağımsız olarak gösterilmiştir.

14.4 Poli(A) ile histonSL kombinasyonu tarafından protein ekspresyonundaki artış spesifikdir

Poli(A) ve histonSL kombinasyonunun, mRNA'dan protein ekspresyonu üzerindeki etkisinin spesifik olup olmadığını araştırmak için poli(A) ile kombinasyon halinde alternatif sekanslara sahip mRNA'lar sentezlendi: Bu mRNA'lar ayrı ayrı, A64'ün 3' 'ünde, yedi farklı sekanstan birini ihtiva ediyordu. Lusiferazı şifreleyen mRNA'lar veya kontrol mRNA, HeLa hücreleri içine elektropore edildi. Lusiferaz düzeyleri, transfeksiyondan 6, 24 ve 48 saat sonra ölçüldü (bakınız aşağıdaki Tablo 11 ve Şekil 24).

Tablo 11:

mRNA	6 saatte RLU	24 saatte RLU	48 saatte RLU
ppLuc(GC)-ag-A64-N32	33501	38979	2641
ppLuc(GC)-ag-A64-SL	28176	20364	874
ppLuc(GC)-ag-A64-U30	41632	54676	3408
ppLuc(GC)-ag-A64-G30	46763	49210	3382
ppLuc(GC)-ag-A64-PolioCL	46428	26090	1655
ppLuc(GC)-ag-A64-aCPSL	34176	53090	3338
ppLuc(GC)-ag-A64-ag	18534	18194	989
ppLuc(GC)-ag-A64-histonSL	282677	437543	69292
ppLuc(GC)-ag-histonSL	27597	3171	0
ppLuc(GC)-ag-A64	14339	48414	9357

Bir poli(A) sekansı veya histonSL, denk lusiferaz düzeylerine yol açtı. Yine poli(A) ve histonSL kombinasyonu, tek tek elemanların herhangi biri ile gözlemlenen düzeyin birkaç kat üzerinde lusiferaz düzeyini güçlü şekilde arttırarak böylelikle sinerjistik tesir gösterdi. Buna karşılık poli(A)'nın alternatif sekanslardan biri ile birleştirilmesi, sadece bir poli(A) sekansı ihtiva eden mRNA'ya kıyasla lusiferaz düzeyi üzerinde etkisizdi. Böylelikle poli(A) ve histonSL kombinasyonu, mRNA'dan protein ekspresyonunu sinerjistik şekilde arttırır ve bu etki spesifiktir.

14.5 Poli(A) ve histonSL kombinasyonu, in vivo mRNA'dan protein ekspresyonunu sinerjistik şekilde arttırır.

Poli(A) ile histonSL kombinasyonunun, in vivo mRNA'dan protein ekspresyonu üzerindeki etkisini araştırmak için alfa-globin 3'-UTR'nin farklı 3' sekanslarına sahip, Lusiferazı şifreleyen mRNA'lar veya kontrol mRNA, farelere intradermal yoldan enjekte edildi: mRNA'lar, bir A64 poli(A) sekansı veya bir histonSL ya da 3'-UTR'nin hem A64 poli(A) hem histonSL 3' 'ünü ihtiva ediyordu. Lusiferaz düzeyleri, enjeksiyondan 16 saat sonra ölçüldü (bakınız aşağıdaki Tablo 12 ve Şekil 25).

10

Tablo 12:

mRNA	16 saatte RLU
ppLuc(GC)-ag-A64-histonSL	38081
ppLuc(GC)-ag-histonSL	137
ppLuc(GC)-ag-A64	4607

Lusiferaz, bir histonSL'ye veya bir poli(A) sekansına sahip mRNA'dan eksprese edildi. Bununla birlikte çarpıcı şekilde poli(A) ve histonSL kombinasyonu, tek tek elemanların herhangi biri ile gözlemlenen düzeyin birkaç kat üzerinde lusiferaz düzeyini güçlü şekilde arttırdı. Aynı mRNA içinde poli(A) ve histonSL'nin birleştirilmesine bağlı olarak lusiferaz düzeyinde meydana gelen artışın büyüklüğü, bunların sinerjistik şekilde tesir gösterdiğini ortaya koyar.

20 Poli(A) ve histonSL arasındaki sinerji, poli(A)-histonSL mRNA'dan (+/+) gelen sinyalin, histonSL mRNA'dan (-/+) ve poli(A) mRNA'dan (+/-) gelen sinyallerin toplamına bölünmesi suretiyle nicelendirildi (bakınız aşağıdaki Tablo 13).

25

Tablo 13:

	A64	histonSL	16 saatte RLU
	+	+	38081
	-	+	137
	+	-	4607
Sinerji			8.0

Bu şekilde hesaplanan faktör, poli(A) ve histonSL'yi birleştiren mRNA'dan edinilen lusiferaz düzeyinin, poli(A) ve histonSL'nin etkileri tamamen toplamsal olsa idi beklenenecek olandan ne kadar daha yüksek olduğunu belirtir. poli(A) ve histonSL'yi birleştiren mRNA'dan edinilen lusiferaz düzeyi, bunların etkileri tamamen toplamsal olsa idi sağlanacak olan düzeyden 8 kat daha yüksekti. Bu sonuç, poli(A) ve histonSL kombinasyonunun, in vivo protein ekspresyonunda çarpıcı şekilde sinerjistik bir artış sağladığını teyit eder.

14.6 Poli(A) ve histonSL kombinasyonu, mRNA'dan NY-ESO-1 protein ekspresyonunu arttırır.

15

Poli(A) ile histonSL kombinasyonunun, mRNA'dan protein ekspresyonu üzerindeki etkisini araştırmak için alfa-globin 3'-UTR'nin farklı 3' sekanslarına sahip, NY-ESO-1'i şifreleyen mRNA'lar sentezlendi: mRNA'lar, 3'-UTR'nin 3' 'ünde bir A64 poli(A) sekansı veya hem A64 poli(A) hem histonSL ihtiva ediyordu. NY-ESO-1'i şifreleyen mRNA'lar, HeLa hücreleri içine elektropore edildi. NY-ESO-1 düzeyleri, transfeksiyondan 24 saat sonra akış sitometresi ile ölçüldü (bakınız aşağıdaki Tablo 14 ve Şekil 26).

25

Tablo 14:

mRNA	24 saatte MFI	
	anti-NY-ESO-1	izotip kontrolü
NY-ESO-1 (GC)-ag-A64-histonSL	15600	1831
NY-ESO-1 (GC)-ag-A64	1294	849

NY-ESO-1, sadece bir poli(A) sekansına sahip mRNA'dan eksprese edildi. Bununla birlikte çarpıcı şekilde poli(A) ve histonSL kombinasyonu, sadece bir poli(A) sekansı ile gözlemlenen düzeyin birkaç kat üzerinde NY-ESO-1 düzeyini güçlü şekilde arttırdı.

14.7 Poli(A) ve histonSL kombinasyonu, mRNA ile aşılama yoluyla uyandırılan antikor düzeyini artırır.

10

Poli(A) ile histonSL kombinasyonunun, mRNA ile aşılama yoluyla uyandırılan antikorların indüklenmesi üzerindeki etkisini araştırmak için C57BL/6 fareleri,

alfa-globin 3'-UTR'nin farklı 3' sekanslarına sahip, protamin ile kompleksleştirilmiş, NY-ESO-1'i şifreleyen mRNA'lar ile intradermal yoldan aşılandı. mRNA'lar, 3'-UTR'nin 3' 'ünde bir A64 poli(A) sekansı veya hem A64 poli(A) hem histonSL ihtiva ediyordu. Aşılanmış farelerde ve kontrol farelerinde NY-ESO-1'e spesifik antikorların düzeyi, seri serum seyreltileri ile ELISA ile analiz edildi (bakınız aşağıdaki Tablo 15 ve Şekil 27).

20

Tablo 15:

mRNA	ortalama IgG2a[b] uç nokta titeri
NY-ESO-1 (GC)-ag-A64-histonSL	763
NY-ESO-1 (GC)-ag-A64	20

Anti NY-ESO-1 IgG2a[b], sadece bir poli(A) sekansına sahip mRNA tarafından indüklendi. Bununla birlikte çarpıcı şekilde poli(A) ve histonSL kombinasyonu, sadece bir poli(A) sekansı ile gözlemlenen düzeyin birkaç kat üzerinde anti NY-ESO-1 IgG2a[b] düzeyini güçlü
5 şekilde arttırdı.

SEKANS LİSTESİ

- <110> CUREVAC AG
- 10 <120> Şifrelenmiş bir tümör antijeninin ekspresyonunun arttırılmasına yönelik bir histon sap-ilmği ve bir poli(a) sekansı veya bir poliadenilasyon sinyali içeren veya bunun için kodlama yapan nükleik asit
- <130> CU01P128WO1EPT1
- 15 <140> PCT/EP2012/000674
- <141> 2012-02-15
- <160> 58
- <170> PatentIn version 3.5
- <210> 1
- 20 <211> 16
- <212> RNA
- <213> suni
- <220>
- <223> formül (Ic)'ye göre histon sap-ilmği sekansı: sap sınırlama
25 elemanları olmayan metazoan ve protozoan histon sap-ilmik konsensus sekansı
- <220>
- <221> çeşitli_özellik

- <222> (1)..(1)
- <223> n, A, U, T, G ve C arasından seçilen nükleotit veya bunun bir nükleotit analogu arasından seçilir
- <220>
- 5 <221> çeşitli_özellik
- <222> (3)..(8)
- <223> n, A, U, T, G ve C arasından seçilen nükleotit veya bunun bir nükleotit analogu arasından seçilir
- <220>
- 10 <221> çeşitli_özellik
- <222> (10)..(14)
- <223> n, A, U, T, G ve C arasından seçilen nükleotit veya bunun bir nükleotit analogu arasından seçilir
- <220>
- 15 <221> çeşitli_özellik
- <222> (16)..(16)
- <223> n, A, U, T, G ve C arasından seçilen nükleotit veya bunun bir nükleotit analogu arasından seçilir
- <400> 1
- 20 ngnnnnnnun nnnncn 16
- <210> 2
- <211> 26
- <212> RNA
- <213> suni
- 25 <220>
- <223> formül (IIc)'ye göre histon sap-ilmîği sekansı: sap sınırlama elemanları ile metazoan ve protozoan histon sap-ilmik konsensus sekansı

<220>

<221> çeşitli_özellik

<222> (1)..(6)

<223> n, A, U, T, G ve C arasından seçilen nükleotit veya bunun bir
5 nükleotit analogu arasından seçilir

<220>

<221> çeşitli_özellik

<222> (8)..(13)

<223> n, A, U, T, G ve C arasından seçilen nükleotit veya bunun bir
10 nükleotit analogu arasından seçilir

<220>

<221> çeşitli_özellik

<222> (15)..(19)

<223> n, A, U, T, G ve C arasından seçilen nükleotit veya bunun bir
15 nükleotit analogu arasından seçilir

<220>

<221> çeşitli_özellik

<222> (21)..(26)

<223> n, A, U, T, G ve C arasından seçilen nükleotit veya bunun bir
20 nükleotit analogu arasından seçilir

<400> 2

nnnnnnngnnnn nnnunnnnnnc nnnnnnn 26

<210> 3

<211> 16

25 <212> RNA

<213> suni

<220>

<223> formül (Id)'ye göre histon sap-ilmiği sekansı: sap sınırlama elemanları olmadan

<220>

5 <221> çeşitli_özellik

<222> (1)..(1)

<223> n, A, U, T, G ve C arasından seçilen nükleotit veya bunun bir nükleotit analogu arasından seçilir

<220>

10 <221> çeşitli_özellik

<222> (3)..(8)

<223> n, A, U, T, G ve C arasından seçilen nükleotit veya bunun bir nükleotit analogu arasından seçilir

<220>

15 <221> çeşitli_özellik

<222> (10)..(14)

<223> n, A, U, T, G ve C arasından seçilen nükleotit veya bunun bir nükleotit analogu arasından seçilir

<220>

20 <221> çeşitli_özellik

<222> (16)..(16)

<223> n, A, U, T, G ve C arasından seçilen nükleotit veya bunun bir nükleotit analogu arasından seçilir

<400> 3

25 ncnnnnnnnnun nnnnngn 16

<210> 4

<211> 26

<212> RNA

<213> suni

<220>

<223> formül (IId)'ye göre histon sap-ilmîği sekansı: sap sınırlama

5 elemanları ile

<220>

<221> çeşitli_özellik

<222> (1)..(6)

<223> n, A, U, T, G ve C arasından seçilen nükleotit veya bunun bir

10 nükleotit analogu arasından seçilir

<220>

<221> çeşitli_özellik

<222> (8)..(13)

<223> n, A, U, T, G ve C arasından seçilen nükleotit veya bunun bir

15 nükleotit analogu arasından seçilir

<220>

<221> çeşitli_özellik

<222> (15)..(19)

<223> n, A, U, T, G ve C arasından seçilen nükleotit veya bunun bir

20 nükleotit analogu arasından seçilir

<220>

<221> çeşitli_özellik

<222> (21)..(26)

<223> n, A, U, T, G ve C arasından seçilen nükleotit veya bunun bir

25 nükleotit analogu arasından seçilir

<400> 4

nnnnnnncnnnn nnnunnnnnng nnnnnnn

- <210> 5
- <211> 16
- <212> RNA
- <213> suni
- 5 <220>
- <223> formül (Ie)'ye göre histon sap-ilmği sekansı: sap sınırlama elemanları olmayan protozoan histon sap-ilmik konsensus sekansı
- <220>
- <221> çeşitli_özellik
- 10 <222> (3)..(8)
- <223> n, A, U, T, G ve C arasından seçilen nükleotit veya bunun bir nükleotit analogu arasından seçilir
- <220>
- <221> çeşitli_özellik
- 15 <222> (10)..(14)
- <223> n, A, U, T, G ve C arasından seçilen nükleotit veya bunun bir nükleotit analogu arasından seçilir
- <400> 5
- dgnnnnnnnun nnnnch 16
- 20 <210> 6
- <211> 26
- <212> RNA
- <213> suni
- <220>
- 25 <223> formül (Ile)'ye göre histon sap-ilmği sekansı: sap sınırlama elemanları ile protozoan histon sap-ilmik konsensus sekansı
- <220>
- <221> çeşitli_özellik

- <222> (1)..(5)
 <223> n, A, U, T, G ve C arasından seçilen nükleotit veya bunun bir nükleotit analogu arasından seçilir
 <220>
- 5 <221> çeşitli_özellik
 <222> (8)..(13)
 <223> n, A, U, T, G ve C arasından seçilen nükleotit veya bunun bir nükleotit analogu arasından seçilir
 <220>
- 10 <221> çeşitli_özellik
 <222> (15)..(19)
 <223> n, A, U, T, G ve C arasından seçilen nükleotit veya bunun bir nükleotit analogu arasından seçilir
 <220>
- 15 <221> çeşitli_özellik
 <222> (22)..(26)
 <223> n, A, U, T, G ve C arasından seçilen nükleotit veya bunun bir nükleotit analogu arasından seçilir
 <400> 6
- 20 nnnnndgnnnn nnnunnnnnnc hnnnnnn 26
 <210> 7
 <211> 16
 <212> RNA
 <213> suni
- 25 <220>
 <223> formül (If)'ye göre histon sap-ilmği sekansı: sap sınırlama elemanları olmayan metazoan histon sap-ilmik konsensus sekansı

<220>

<221> çeşitli_özellik

<222> (1)..(1)

<223> n, A, U, T, G ve C arasından seçilen nükleotit veya bunun bir
5 nükleotit analogu arasından seçilir

<220>

<221> çeşitli_özellik

<222> (3)..(3)

<223> n, A, U, T, G ve C arasından seçilen nükleotit veya bunun bir
10 nükleotit analogu arasından seçilir

<220>

<221> çeşitli_özellik

<222> (7)..(8)

<223> n, A, U, T, G ve C arasından seçilen nükleotit veya bunun bir
15 nükleotit analogu arasından seçilir

<220>

<221> çeşitli_özellik

<222> (10)..(10)

<223> n, A, U, T, G ve C arasından seçilen nükleotit veya bunun bir
20 nükleotit analogu arasından seçilir

<220>

<221> çeşitli_özellik

<222> (12)..(12)

<223> n, A, U, T, G ve C arasından seçilen nükleotit veya bunun bir
25 nükleotit analogu arasından seçilir

<220>

<221> çeşitli_özellik

<222> (14)..(14)

- <223> n, A, U, T, G ve C arasından seçilen nükleotit veya bunun bir nükleotit analogu arasından seçilir
- <220>
- <221> çeşitli_özellik
- 5 <222> (16)..(16)
- <223> n, A, U, T, G ve C arasından seçilen nükleotit veya bunun bir nükleotit analogu arasından seçilir
- <400> 7
- ngnbyynnun vndncn 16
- 10 <210> 8
- <211> 26
- <212> RNA
- <213> suni
- <220>
- 15 <223> formül (IIf)'ye göre histon sap-ilmîği sekansı: sap sınırlama elemanları ile metazoan histon sap-ilmik konsensus sekansı
- <220>
- <221> çeşitli_özellik
- <222> (1)..(6)
- 20 <223> n, A, U, T, G ve C arasından seçilen nükleotit veya bunun bir nükleotit analogu arasından seçilir
- <220>
- <221> çeşitli_özellik
- <222> (8)..(8)
- 25 <223> n, A, U, T, G ve C arasından seçilen nükleotit veya bunun bir nükleotit analogu arasından seçilir
- <220>
- <221> çeşitli_özellik

<222> (12)..(13)

<223> n, A, U, T, G ve C arasından seçilen nükleotit veya bunun bir nükleotit analogu arasından seçilir

<220>

5 <221> çeşitli_özellik

<222> (15)..(15)

<223> n, A, U, T, G ve C arasından seçilen nükleotit veya bunun bir nükleotit analogu arasından seçilir

<220>

10 <221> çeşitli_özellik

<222> (17)..(17)

<223> n, A, U, T, G ve C arasından seçilen nükleotit veya bunun bir nükleotit analogu arasından seçilir

<220>

15 <221> çeşitli_özellik

<222> (19)..(19)

<223> n, A, U, T, G ve C arasından seçilen nükleotit veya bunun bir nükleotit analogu arasından seçilir

<220>

20 <221> çeşitli_özellik

<222> (21)..(26)

<223> n, A, U, T, G ve C arasından seçilen nükleotit veya bunun bir nükleotit analogu arasından seçilir

<400> 8

25 nnnnnngnby ynnunvndnc nnnnnn 26

<210> 9

<211> 16

<212> RNA

<213> suni

<220>

<223> formül (Ig)'ye göre histon sap-ilmği sekansı: sap sınırlama

5 elemanları olmayan omurgalı histon sap-ilmik konsensus sekansı

<220>

<221> çeşitli_özellik

<222> (1)..(1)

<223> n, A, U, T, G ve C arasından seçilen nükleotit veya bunun bir

10 nükleotit analogu arasından seçilir

<220>

<221> çeşitli_özellik

<222> (8)..(8)

<223> n, A, U, T, G ve C arasından seçilen nükleotit veya bunun bir

15 nükleotit analogu arasından seçilir

<220>

<221> çeşitli_özellik

<222> (16)..(16)

<223> n, A, U, T, G ve C arasından seçilen nükleotit veya bunun bir

20 nükleotit analogu arasından seçilir

<400> 9

nghyyydnuh abrdcn 16

<210> 10

<211> 26

25 <212> RNA

<213> suni

<220>

<223> formül (IIg)'ye göre histon sap-ilmği sekansı: sap sınırlama elemanları ile omurgalı histon sap-ilmik konsensus sekansı

<220>

5 <221> çeşitli_özellik

<222> (1)..(2)

<223> n, A, U, T, G ve C arasından seçilen nükleotit veya bunun bir nükleotit analogu arasından seçilir

<220>

10 <221> çeşitli_özellik

<222> (4)..(6)

<223> n, A, U, T, G ve C arasından seçilen nükleotit veya bunun bir nükleotit analogu arasından seçilir

<220>

15 <221> çeşitli_özellik

<222> (13)..(13)

<223> n, A, U, T, G ve C arasından seçilen nükleotit veya bunun bir nükleotit analogu arasından seçilir

<220>

20 <221> çeşitli_özellik

<222> (21)..(25)

<223> n, A, U, T, G ve C arasından seçilen nükleotit veya bunun bir nükleotit analogu arasından seçilir

<400> 10

25 nnhnnnghyy ydnuhabrdc nnnnnh 26

<210> 11

<211> 16

- <212> RNA
- <213> suni
- <220>
- <223> formül (Ih)'ye göre histon sap-ilmği sekansı: sap sınırlama
- 5 elemanları olmayan insan histon sap-ilmik konsensus sekansı (Homo sapiens)
- <400> 11
- dghycudyuh asrrcc 16
- <210> 12
- 10 <211> 26
- <212> RNA
- <213> suni
- <220>
- <223> formül (IIh)'ye göre histon sap-ilmği sekansı: sap sınırlama
- 15 elemanları ile insan histon sap-ilmik konsensus sekansı (Homo sapiens)
- <220>
- <221> çeşitli_özellik
- <222> (1)..(1)
- 20 <223> n, A, U, T, G ve C arasından seçilen nükleotit veya bunun bir nükleotit analogu arasından seçilir
- <220>
- <221> çeşitli_özellik
- <222> (25)..(25)
- 25 <223> n, A, U, T, G ve C arasından seçilen nükleotit veya bunun bir nükleotit analogu arasından seçilir
- <400> 12
- nhaahdghyc udyuhasrrc cvhbnh 26

- <210> 13
 <211> 16
 <212> DNA
 <213> Suni
- 5 <220>
 <223> formül (Ic)'ye göre histon sap-ilmîği sekansları (sap sınırlama elemanları olmayan)
 <400> 13
 vgyyyhhth rvvrcb 16
- 10 <210> 14
 <211> 16
 <212> DNA
 <213> Suni
 <220>
- 15 <223> formül (Ic)'ye göre histon sap-ilmîği sekansları (sap sınırlama elemanları olmayan)
 <400> 14
 sgyyytlytm arrrcs 16
 <210> 15
- 20 <211> 16
 <212> DNA
 <213> Suni
 <220>
 <223> formül (Ic)'ye göre histon sap-ilmîği sekansları (sap sınırlama elemanları olmayan)
- 25 <400> 15
 sgyyctttm agrrcs 16

- <210> 16
 <211> 16
 <212> DNA
 <213> Suni
- 5 <220>
 <223> formül (Ie)'ye göre histon sap-ilmği sekansları (sap sınırlama elemanları olmayan)
 <220>
 <221> çeşitli_özellik
- 10 <222> (3)..(5)
 <223> n, A, U, T, G ve C arasından seçilen nükleotit veya bunun bir nükleotit analogu arasından seçilir
 <220>
 <221> çeşitli_özellik
- 15 <222> (7)..(8)
 <223> n, A, U, T, G ve C arasından seçilen nükleotit veya bunun bir nükleotit analogu arasından seçilir
 <220>
 <221> çeşitli_özellik
- 20 <222> (12)..(14)
 <223> n, A, U, T, G ve C arasından seçilen nükleotit veya bunun bir nükleotit analogu arasından seçilir
 <400> 16
 dgnnnbnnth vnnch 16
- 25 <210> 17
 <211> 16
 <212> DNA
 <213> Suni

<220>

<223> formül (Ie)'ye göre histon sap-ilmği sekansları (sap sınırlama elemanları olmayan)

<220>

5 <221> çeşitli_özellik

<222> (3)..(5)

<223> n, A, U, T, G ve C arasından seçilen nükleotit veya bunun bir nükleotit analogu arasından seçilir

<220>

10 <221> çeşitli_özellik

<222> (13)..(14)

<223> n, A, U, T, G ve C arasından seçilen nükleotit veya bunun bir nükleotit analogu arasından seçilir

<400> 17

15 rgnnnyhbth rdnncy 16

<210> 18

<211> 16

<212> DNA

<213> Suni

20 <220>

<223> formül (Ie)'ye göre histon sap-ilmği sekansları (sap sınırlama elemanları olmayan)

<220>

<221> çeşitli_özellik

25 <222> (3)..(3)

<223> n, A, U, T, G ve C arasından seçilen nükleotit veya bunun bir nükleotit analogu arasından seçilir

<220>

<221> çeşitli_özellik

<222> (14)..(14)

<223> n, A, U, T, G ve C arasından seçilen nükleotit veya bunun bir

5 nükleotit analogu arasından seçilir

<400> 18

rgndbyhyth rdhncy 16

<210> 19

<211> 16

10 <212> DNA

<213> Suni

<220>

<223> formül (If)'ye göre histon sap-ilmiği sekansları (sap sınırlama elemanları olmayan)

15 <400> 19

vgyytythth rvrrcb 16

<210> 20

<211> 16

<212> DNA

20 <213> Suni

<220>

<223> formül (If)'ye göre histon sap-ilmiği sekansları (sap sınırlama elemanları olmayan)

<400> 20

25 sgyycttytm agrrcs 16

<210> 21

<211> 16

- <212> DNA
 <213> Suni
 <220>
 <223> formül (If)'ye göre histon sap-ilmîği sekansları (sap sınırlama
 5 elemanları olmayan)
 <400> 21
 sgyycttttm agrres 16
 <210> 22
 <211> 16
 10 <212> DNA
 <213> Suni
 <220>
 <223> formül (Ig)'ye göre histon sap-ilmîği sekansları (sap sınırlama
 elemanları olmayan)
 15 <400> 22
 ggyycttyth agrcc 16
 <210> 23
 <211> 16
 <212> DNA
 20 <213> Suni
 <220>
 <223> formül (Ig)'ye göre histon sap-ilmîği sekansları (sap sınırlama
 elemanları olmayan)
 <400> 23
 25 ggcyccttytm agrgcc 16
 <210> 24
 <211> 16

<212> DNA

<213> Suni

<220>

5 <223> formül (Ig)'ye göre histon sap-ilmği sekansları (sap sınırlama
elemanları olmayan)

<400> 24

ggctcttttm agrgcc 16

<210> 25

<211> 16

10 <212> DNA

<213> Suni

<220>

<223> formül (Ih)'ye göre histon sap-ilmği sekansları (sap sınırlama
elemanları olmayan)

15 <400> 25

dghyctdyth asrrcc 16

<210> 26

<211> 16

<212> DNA

20 <213> Suni

<220>

<223> formül (Ih)'ye göre histon sap-ilmği sekansları (sap sınırlama
elemanları olmayan)

<400> 26

25 ggcyccttth agrgcc 16

<210> 27

<211> 16

<212> DNA

<213> Suni

<220>

5 <223> formül (Ih)'ye göre histon sap-ilmği sekansları (sap sınırlama elemanları olmayan)

<400> 27

ggcyccttttm agrgcc 16

<210> 28

<211> 26

10 <212> DNA

<213> Suni

<220>

<223> formül (IIc)'ye göre histon sap-ilmği sekansı (sap sınırlama elemanları ile)

15 <220>

<221> çeşitli_özellik

<222> (25)..(26)

<223> n, A, U, T, G ve C arasından seçilen nükleotit veya bunun bir nükleotit analogu arasından seçilir

20 <400> 28

hhhhvvggyy yhhthrvrc bvhhnn 26

<210> 29

<211> 26

<212> DNA

25 <213> Suni

<220>

<223> formül (IIc)'ye göre histon sap-ilmği sekansı (sap sınırlama elemanları ile)

- <400> 29
 nhmhmsgyyy ttytmarrre smchhh 26
 <210> 30
 <211> 26
 5 <212> DNA
 <213> Suni
 <220>
 <223> formül (IIc)'ye göre histon sap-ilmği sekansı (sap sınırlama elemanları ile)
 10 <400> 30
 mmmmmmsggyyc tttmagrrc sachmh 26
 <210> 31
 <211> 26
 <212> DNA
 15 <213> Suni
 <220>
 <223> formül (IIe)'ye göre histon sap-ilmği sekansı (sap sınırlama elemanları ile)
 <220>
 20 <221> çeşitli_özellik
 <222> (1)..(5)
 <223> n, A, U, T, G ve C arasından seçilen nükleotit veya bunun bir nükleotit analogu arasından seçilir
 <220>
 25 <221> çeşitli_özellik
 <222> (8)..(10)
 <223> n, A, U, T, G ve C arasından seçilen nükleotit veya bunun bir nükleotit analogu arasından seçilir

<220>

<221> çeşitli_özellik

<222> (12)..(13)

<223> n, A, U, T, G ve C arasından seçilen nükleotit veya bunun bir
5 nükleotit analogu arasından seçilir

<220>

<221> çeşitli_özellik

<222> (17)..(19)

<223> n, A, U, T, G ve C arasından seçilen nükleotit veya bunun bir
10 nükleotit analogu arasından seçilir

<220>

<221> çeşitli_özellik

<222> (22)..(22)

<223> n, A, U, T, G ve C arasından seçilen nükleotit veya bunun bir
15 nükleotit analogu arasından seçilir

<220>

<221> çeşitli_özellik

<222> (24)..(26)

<223> n, A, U, T, G ve C arasından seçilen nükleotit veya bunun bir
20 nükleotit analogu arasından seçilir

<400> 31

nnnnndgnnn bnnthvnnnc hnhnnn 26

<210> 32

<211> 26

25 <212> DNA

<213> Suni

<220>

<223> formül (IIe)'ye göre histon sap-ilmiği sekansı (sap sınırlama elemanları ile)

<220>

5 <221> çeşitli_özellik

<222> (1)..(2)

<223> n, A, U, T, G ve C arasından seçilen nükleotit veya bunun bir nükleotit analogu arasından seçilir

<220>

10 <221> çeşitli_özellik

<222> (5)..(5)

<223> n, A, U, T, G ve C arasından seçilen nükleotit veya bunun bir nükleotit analogu arasından seçilir

<220>

15 <221> çeşitli_özellik

<222> (8)..(10)

<223> n, A, U, T, G ve C arasından seçilen nükleotit veya bunun bir nükleotit analogu arasından seçilir

<220>

20 <221> çeşitli_özellik

<222> (18)..(19)

<223> n, A, U, T, G ve C arasından seçilen nükleotit veya bunun bir nükleotit analogu arasından seçilir

<220>

25 <221> çeşitli_özellik

<222> (25)..(26)

<223> n, A, U, T, G ve C arasından seçilen nükleotit veya bunun bir nükleotit analogu arasından seçilir

- <400> 32
nnhhnrgnnn yhbthrdnnc ydhnnn 26
- <210> 33
<211> 26
- 5 <212> DNA
<213> Suni
<220>
<223> formül (IIe)'ye göre histon sap-ilmği sekansı (sap sınırlama elemanları ile)
- 10 <220>
<221> çeşitli_özellik
<222> (1)..(1)
<223> n, A, U, T, G ve C arasından seçilen nükleotit veya bunun bir nükleotit analogu arasından seçilir
- 15 <220>
<221> çeşitli_özellik
<222> (8)..(8)
<223> n, A, U, T, G ve C arasından seçilen nükleotit veya bunun bir nükleotit analogu arasından seçilir
- 20 <220>
<221> çeşitli_özellik
<222> (19)..(19)
<223> n, A, U, T, G ve C arasından seçilen nükleotit veya bunun bir nükleotit analogu arasından seçilir
- 25 <400> 33
nhhhvrgndb yhythrdhnc yrhhhh 26
<210> 34
<211> 26

<212> DNA

<213> Suni

<220>

5 <223> formül (IIf)'ye göre histon sap-ilmiği sekansı (sap sınırlama elemanları ile)

<220>

<221> çeşitli_özellik

<222> (26).. (26)

10 <223> n, A, U, T, G ve C arasından seçilen nükleotit veya bunun bir nükleotit analogu arasından seçilir

<400> 34

hhmhmvgyyy tyhthrvrrc bvmhhn 26

<210> 35

<211> 26

15 <212> DNA

<213> Suni

<220>

<223> formül (IIf)'ye göre histon sap-ilmiği sekansı (sap sınırlama elemanları ile)

20 <400> 35

mmmmmsggyyc ttytmagrrc smchhh 26

<210> 36

<211> 26

<212> DNA

25 <213> Suni

<220>

<223> formül (IIf)'ye göre histon sap-ilmiği sekansı (sap sınırlama elemanları ile)

- <400> 36
 mmmmmmsggyyc tttmagrrc sachmh 26
 <210> 37
 <211> 26
 5 <212> DNA
 <213> Suni
 <220>
 <223> formül (IIg)'ye göre histon sap-ilmiği sekansı (sap sınırlama elemanları ile)
 10 <220>
 <221> çeşitli_özellik
 <222> (24)..(25)
 <223> n, A, U, T, G ve C arasından seçilen nükleotit veya bunun bir nükleotit analogu arasından seçilir
 15 <400> 37
 hhmamggyyc ttythagrrc cvhnnm 26
 <210> 38
 <211> 26
 <212> DNA
 20 <213> Suni
 <220>
 <223> formül (IIg)'ye göre histon sap-ilmiği sekansı (sap sınırlama elemanları ile)
 <400> 38
 25 hhaamggcyc ttytmagrgc cvchhm 26
 <210> 39
 <211> 26

- <212> DNA
- <213> Suni
- <220>
- <223> formül (IIg)'ye göre histon sap-ilmiği sekansı (sap sınırlama
5 elemanları ile)
- <400> 39
- mmaamggctc tttmagrgc cmcymm 26
- <210> 40
- <211> 26
- 10 <212> DNA
- <213> Suni
- <220>
- <223> formül (IIh)'ye göre histon sap-ilmiği sekansı (sap sınırlama
elemanları ile)
- 15 <220>
- <221> çeşitli_özellik
- <222> (1)..(1)
- <223> n, A, U, T, G ve C arasından seçilen nükleotit veya bunun bir
nükleotit analogu arasından seçilir
- 20 <220>
- <221> çeşitli_özellik
- <222> (25)..(25)
- <223> n, A, U, T, G ve C arasından seçilen nükleotit veya bunun bir
nükleotit analogu arasından seçilir
- 25 <400> 40
- nhaahdghyc tdythasrrc cvhbnh 26
- <210> 41
- <211> 26

- <212> DNA
- <213> Suni
- <220>
- <223> formül (IIh)'ye göre histon sap-ilmiği sekansı (sap sınırlama
5 elemanları ile)
- <220>
- <221> çeşitli_özellik
- <222> (25)..(25)
- <223> n, A, U, T, G ve C arasından seçilen nükleotit veya bunun bir
10 nükleotit analogu arasından seçilir
- <400> 41
- hhaamggcyc tttthagrgc cvmynm 26
- <210> 42
- <211> 26
- 15 <212> DNA
- <213> Suni
- <220>
- <223> formül (IIh)'ye göre histon sap-ilmiği sekansı (sap sınırlama
elemanları ile)
- 20 <400> 42
- hmaaaggcyc tttmagrgc crmyhm 26
- <210> 43
- <211> 1747
- <212> RNA
- 25 <213> suni
- <220>
- <223> ppLuc(GC)-ag'nin mRNA sekansı
- <400> 43

$\langle 210 \rangle$ 44
 $\langle 211 \rangle$ 1806

<212> RNA

<213> suni

<220>

<223> ppLuc(GC)-ag-A64"ün mRNA sekansı

5 <400> 44

gggagaaagc uugaggaugg aggaaggcaa gaacaucaag aaggggccgg cggccuucua	60
cccgcuggag gacgggagccg ccggcgagca gcuccacaag gccaugagc gguacggccu	120
ggugccggggc accauccgcu uacccgagcg ccacaucgag gucgacauca ccuacgggga	180
guacuuaggag auggagcgugc gccugggcga gggcaugaaag cgguaaggcc ugaacaccaa	240
ccacccggau cugggugugcu cggaggaacag ccugcaguu c ucaugccgg ugcugggcgc	300
ccuucuauc gggugggccg uggcccccgc gaacgacau uacacagagc gggagcgugc	360
gaacagcaug gggaucaagg agccgagccgu gguguuccug agcaagaaag gccugcagaa	420
gaucuuagaac gugcagaaag agucggccau cauccagaa agcaucauca uggacagcaa	480
gaccgacuac caggggcuucc agucgaugua cagguuccug accagccacc uccggccggg	540
cuucaacgag uacgacuuug uccgggagag cuuagaccgg gacaaagacc uggcccuuau	600
caugaaacagc aggggcagca ccggccugcc gaagggggug gcccugccgc accggagccgc	660
cugcgugcgc uuucugcag ccggggagcc caucuuccgc aaccagauca uccgggacac	720
cggcauccug agcgugggug ccguccacca cggcuuaggc auuuuacga cccugggcua	780
ccuacuuugc ggcuuaccgg uggucuuuau guacccgguu gaggagggag uguuuccugc	840
gagccugcag gacuaaaga uccagagcgc gcugcucgug ccgacccug ucaugcuuuu	900
cgccaaagac acccuuagug acaaguuacga ccugucgaa cugcacgaga uggccagcgg	960

gugugccccg	cugagcaagg	agugugugcga	gugugugugcc	aguguguguc	accuccugug	1020
cauccugccag	gugugugugcc	ugagcugagac	cagcugugug	auccuguguc	ccccugugug	1080
gugugagcaag	cugugugugcc	ugugcagugug	guguguguguc	uugcugugcc	agugugugug	1140
ccugugagcag	gugagagagcc	ugugugugug	ccagcugugug	gagcugugug	ugugugugugcc	1200
gagugagcag	agugugugag	ugagagagcc	gugugugagcc	agcuccuguc	ugagagagug	1260
cugugugugug	cagcugugug	agaguguguc	cugugagagag	gagcugaguc	uccuccugug	1320
cagcugugug	agugugugag	ucagugagag	gugugagagag	gugugugugug	cugagcugug	1380
gagcagucug	cuccagcagcc	ccagagucug	cagcugugug	gugugugugug	ugcugugagag	1440
cagcugugug	gagugugugug	cugugugugug	gugugugugag	cagcugagag	ccagugagug	1500
gagugagaguc	gugagcagag	ugcagagcc	gugagagcag	gagagagagc	ugcugugugug	1560
cuguguguguc	gugugagagag	ucccagagug	ccugagcugug	agcugagagc	ccugagagag	1620
ccugugagaguc	cugagcagag	ccagagagug	cugcagaguc	gugugugagag	agagugugag	1680
agcugagaguc	gugcagagug	ccuccagag	gugcuguguc	ccuccugug	agcugagaguc	1740
auagagagagag	agagagagagag	agagagagagag	agagagagagag	agagagagagag	agagagagagag	1800
aaaaaa						1806

<210> 45

<211> 1772

5 <212> RNA

<213> suni

<220>

<223> ppLuc(GC)-ag-histonSL'nin mRNA sekansı

<210> 46

<211> 1835

<212> RNA

<213> suni

<220>

<223> ppLuc(GC)-ag-A64-histonSL'nin mRNA sekansı

5 <400> 46

gggagaaagc uugaggaugg aggaagccaa gaacaucaag aagggcccg cgcuccuua	60
cccgcuggag gaaggggaccg cggcgagagca gcuccacaag gccauagaagc gguacgccc	120
ggugccggggc acgaucgccc uacccgagcg ccacauagag gucgaacaua ccuacgagg	180
guacuuagag aagagcuguc gcucggccga ggccauagaag cgguaagggc ugaacaccaa	240
ccacccggauc guggugugcu cggaggaacag ccugcaguuu ucauagccgg ucuggggccc	300
ccucuucauc ggcgugggcg ugcggccggc gaacgacauu uacaacgagc gggagcugcu	360
gaacagcaug gggaucaagg agccgaccgu gguguuugug agcaagaggg gccugcagaa	420
gauccugaac gugcagaaga agcugcccau cauccagaag aucaucaua uggacagcaa	480

gaccogacuaac	caggggcuuucc	agucggaugua	cacguuocguu	accagccacc	uccocgocggg	540
cuucaacgag	uacgacuuuc	ucccggaagg	cuuagacocgg	gacacgaccca	uccgcccugau	600
caugacacagc	agocggcagca	cocggocuuoc	gacggggggug	gcccugococ	accgggacoc	660
cugocguoc	uuucgocac	cocgggaccc	caucuuocg	aacacgacua	uccocggacac	720
cggccauccug	agocguugug	cguuccaccca	cggcuuocg	auguucacga	cccugggcuu	780
ocucacucg	ggcuuocggg	ugguccocgu	guacocguu	gagcagcagc	uguuocugoc	840
gagccuocag	gacuaacaga	uocagagoc	gucguuocgu	cgcacccug	uacgcuuucuu	900
cggccagagc	accuugauc	acacguacga	ccugucgac	cugcacgaga	uccgcccggg	960
ggggccccc	cugacgacag	agguuggocga	ggocguugoc	agcogguu	accuococgg	1020
cauocgccc	ggcuacggcc	ugacccgagac	cacgagoc	auccugauc	cccccggggg	1080
ggacgacacag	cggggcggc	ugggcagguu	ggucccguu	uuocgagcc	agguugguu	1140
ccugggacccc	ggcacggccc	ugggcguu	ccagocggg	gagcuuugc	ugocggggcc	1200
gcuuacucug	agocguuac	ugacacaccc	ggagggccacc	aacgcccua	uccgacacgga	1260
cggcuugcu	cacagocgg	acauocguu	cugggagcag	gacgagcacu	uuuacauug	1320
cgcacggcu	agguccug	uacagucac	ggguuacac	guugcggcc	ccgagcuug	1380
gagcucucug	cuccagcacc	ccacacuuu	cgcgcccoc	guugcccgg	ugocgggacga	1440
cgcacococ	gagcuuoc	cocggguu	guugcuugag	cacggcagga	ccauugacgga	1500
gacgggagau	guocgacua	ugggcagcca	guugaccc	gccaagagc	ugocggggc	1560
cguugguu	guugacgag	ucccgacgg	ccugacoc	agcucgac	ccocggagau	1620
ccgocgagau	cugaucag	ccaggaagg	cggcacgac	gcccuguaag	acuauguuu	1680
agacugacua	gcccgaug	ccuccacac	ggcccucuc	ccuccuug	accgagauu	1740
uuuuuuuuuu	uuuuuuuuuu	uuuuuuuuuu	uuuuuuuuuu	uuuuuuuuuu	uuuuuuuuuu	1800
uuuuuuuuuu	uuuuuuuuuu	uuuuuuuuuu	uuuuuuuuuu	uuuuuuuuuu	uuuuuuuuuu	1835

<210> 47

<211> 1869

5 <212> RNA

<213> suni

<220>

<223> ppLuc(GC)-ag-A120"ün mRNA sekansı

<400> 47

gggagagagc	uugaggaugg	aggacgccaa	gaacaucaag	aaggggccgg	cgcccuucua	60
cccgcuggag	gacgggacgg	cggcgaagca	gcuccacaa	gccauagaagc	gguaacggccu	120
ggugccggggc	acgaucggcu	ucaccgacgc	ccacaucgag	gucgacauca	ccuacgcggga	180
gnaucucgag	augagcgugc	gccugggccga	ggccauagaag	cgguaacggcc	ugaacacccaa	240
ccacccggau	guugugugcu	cggaggaacag	ccugcaguu	uucaugccgg	ugcugggcg	300
ccucuucauc	ggcgugggcg	ucgccccggc	gaacgacau	uacaaaggagc	gggagcugcu	360
gaacagcaug	gggaucagcc	agccgacccgu	gugugucug	agcaagaaagg	gccugcagaa	420
gaucucgaac	gugcagagaa	agcugcccau	cauccagaag	aucaucauca	uggacagcaa	480
gaccgacuac	caggggcuuc	agucgaugua	cacgucug	accagccacc	ucccgccggg	540
cuaacacgag	uacgacucg	ucccggaagag	cuaacgacgg	gacaaagacc	ucccgcuuau	600
caugaacagc	agcggcagca	cgggccugcc	gaagggggug	gccuugccgg	accggacccg	660
cugcgugcg	uuucgcacg	cccgggaccc	caucuuccgg	aaccagauca	ucccggaac	720
cggcucucug	agcguggguc	cguuacacac	cggucucggc	auguuacagg	cccuaggcuu	780
ccucaucugc	ggcuuccggg	ugguccugau	guaccgguu	gaggagagagc	uguuccuugc	840
gagccugcag	gacuaacaga	uccagagcg	gcugcucug	ccgacccug	ucaucuuuu	900
cggcagagc	accucgaucg	acagguacga	ccugucgaac	cugacagaga	ucccgagggg	960
ggggccccc	cugagcagag	aggugggcga	ggccgugggc	aaggcgguuc	accuccgggg	1020
cauccggccag	ggcuacgggc	ugaccggagac	cacgagcgcg	aucugauca	ccccggaggg	1080
ggacgacaa	cggggcgccg	ugggcaagggu	gguccccgu	uuaggaggca	agguggugga	1140
ccuggacacc	ggcaagaccc	uggggcugaa	ccaggggggc	gagcugugcg	uggggggggc	1200
gaugaucaug	agcggcuaag	ugaaacaccc	ggagggccac	aacgcccuc	uccgacaaag	1260
cggcuggcug	cacagcgggc	acaucggccu	cugggacgag	gacgagcacu	uccuacucgu	1320
cggccggcg	aagucgcug	ucaaguaaca	gggcuaccaa	gugggcgccg	ccgagcugga	1380
gagcaucucg	cuccagcac	ccaaacuuuu	cagccggcg	gugggcgggc	ucccggaagg	1440
cgaacggcg	gagcugccgg	cccggguggu	guguguggag	cacggcaaga	ccaugacggg	1500
gaaggagau	guogacuaag	uggccaggcc	guggacac	gccaaagagc	uggggggggg	1560
cuggguguu	guggacgag	ucccgaaagg	ccugacgggg	aagcucgag	cccggaagau	1620
ccggogagau	cugaucagag	ccaggaaggg	cggcaagau	gccguguaag	accuguuuu	1680
agacugacua	gccccgaugg	ccucccaacg	ggcccuccuc	cccuccuugc	accgagauuu	1740
auagaucuaa	aaaaaa	aaaaaa	aaaaaa	aaaaaa	aaaaaa	1800
aaaaaa	aaaaaa	aaaaaa	aaaaaa	aaaaaa	aaaaaa	1860
aaaaaa						1866

<210> 48

<211> 1858

<212> RNA

<213> suni

5 <220>

<223> ppLuc(GC)-ag-A64-ag'nin mRNA sekansı

<400> 48

[illegible]

<210> 49

<211> 1894

<212> RNA

<213> suni

5 <220>

<223> ppLuc(GC)-ag-A64-aCPSL'nin mRNA sekansı

<400> 49

gggagaaagc uugaggaugg aggaagccaa gaacaucaag aagggccccc cgcuccuua	60
cccgcuggaag gaaggggaccg cgggcgagca gcuccacaag gccauagaagc gguacgccc	120
ggucccccggc accgaucgccc uacccgagccg ccacaucgag gucgaacaua ccuacgggga	180
guacuuagagc auggagcuguc gcucggccga ggcacugaaag cgguaagggcc ugaacaccaa	240
ccacccggaua gugguguguc cgggaagaaag ccugcaguuu uucaugccggc ugucggggc	300
ccuuuuauc uggugugccg ucccccgggc gaacgacaua uacacagagc gggagcuguc	360
gaacagcaug gggauacgccc agccgagccgu gguugucgag agcaagaaag gccugcagaa	420
gaucucgaaac gugcagaaagc agucgcccua cauccagaaag auaucauca uggagcagcaa	480
gaacgaguuac caggugcuucc agucgaguuu caguuucgag accagccacc ucccggccgg	540
cuaacacagag uacgagcuucc ucccggagag cuucgacccg gacaaagacc ugcgccuua	600
cauuaacagc agcggcagca cccggccguc gaagggggug gcccugccgc accggaccgc	660
cugcugugcc uucucgacag cccgggacc ccauuucguc aaccagauca ucccggacac	720
cggcauuccg agcguugugc cguuaccacc cggcuucggc augguacaga cccugggcu	780
ccuacauucg cgcuuucggc uggucucgaa gaacccgguu gaggagggagc uguuuccugc	840
gagccugcagc gaauacaaagc uccagagccgc gcugucugug cccagcccuu uacgcuuucu	900
cggcaagagc acccugaucc acaaguuagc ccuugcgaac cugcagagga ugcacagcgg	960
gggcccggcc cugagcaagc agguaggccga ggcggugccc aagcgguucc accuaccggc	1020
cauuccgacg gguuacggcc ugaacgagac cagcagccgc auccugauca ccccggaggg	1080
ggacgacaaag cggggcggcc ugggcaaggu ggucccgguu uucgagggca agguugugga	1140
ccuaggacac ggcagacccc ugggcccuga ccagccgggc gaggcuugcc ugccggggcc	1200
gaugaucaug agcggcuacg ugaacacccc ggaaggccacc aacgcccua ugcacaaagg	1260
ccgucggcuu caccggggcc acauccgcuu cuaggagagc gacgagcacu ucuuacuguu	1320
ccagccggcuu aagucgcuua ucaaguuaca gggcuuacag guugcggccg cccagcugua	1380
gagcauuccg cuccagacac ccacacuuuu cgaagccggc guggcggggc ugcgggagca	1440
ccagccggcc gaggcuagcc cccggguguu gguugcugagc cccggcagga ccaugagga	1500

```

gaaggagauC guogacuaag uggccagcca ggugaccacc gccaaagaagc ugcggggcgg 1560
cgugguguuC guggacgagg ucccgaaggg ccugaccggg aagcucgagc ccogggaagau 1620
ccgcgagauC cugaucaagg ccaagaaggg cggcaagauC gccguguaag acuaguuaua 1680
agacugacua gccogauggg ccucccaagc ggcucccuc ccucccuugc accogagaaua 1740
auaaaaaa aaaaaaaa aaaaaaaa aaaaaaaa aaaaaaaa aaaaaaaa 1800
aaaaaauca ucaauuocua caogugaggc gcugugauuc ccuaucuccc uucauucccu 1860
auacauuagc acagcgccau ugcauguaag aaau 1894

```

<210> 50

<211> 1909

5 <212> RNA

<213> suni

<220>

<223> ppLuc(GC)-ag-A64-PolioCL'nin mRNA sekansı

<400> 50

[illegible]

<210> 51

<211> 1841

<212> RNA

<213> suni

5 <220>

<223> ppLuc(GC)-ag-A64-G30'ün mRNA sekansı

<400> 51

gggagaaagc uugaggauug aggacgccaa gaacaucaag aaggggcccg cgcuccuua	60
cccgcuggag gacgggaccg cggcgagca gcuccacaag gccaugagc gguacgccu	120
ggugccgggc acgaucgcu uacccgacgc ccacaucgag gucgaauca ccuacggga	180
guacuuagag auggagcugc ggcuggcga ggcacugaa cgguaaggcc ugaacacca	240
ccaccggau cugggugugc cggagaaacg ccugcaguu ucauagccg ugcuggggc	300
ccuucuauc ggugugggc ugcgccggc gaacgacau uacaaaggc gggaugcu	360
gaacagcaug gggaucagcc agccgacgcu gguguuugug agcaaggagg gcugcagaa	420
gauccugaac gucagaaag agcugccau cauccagaag auaucauca uggacagca	480
gacogacua cagggcuu ccaggaugua caguuugug accagccac uccggccgg	540
cuaacagag uacgacuu cccgggagag cuucgacgg gacaaagcca ucgccuuga	600
caugaacagc agcggcagca ccggccugcc gaaggggug gcccugccg accggaccg	660
cugcgugggc uucucgcacg ccggggacc caucuuugc aaccagaua uccgggacac	720
cgccauccug agcgugugc cguccacca cggcuuggc auguacaga gccugggua	780
ccuacuuugc ggcuuaggg ugguccugau gaacggguu gaggaggagc uguuuccug	840

gagccugcag	gacuaacaaga	uccagaagccg	gcugcucugug	ccgacccugug	ucaucucucuu	900
cgcccaagagc	acccugauucg	acaaguuacga	ccugucgaaac	cugcacgaga	ucgccagcgg	960
gggcccgcgcg	cugagcaagug	agugggggcga	ggccgugggcc	aagccgguucc	accucccgggg	1020
cauccggccag	ggcuacggccc	ugacccgagac	cacgagcggcg	auccugauca	cccccgagggg	1080
ggacgacaaag	ccggggcggccg	ugggcaagugug	ggucgccuguc	uucgagggcca	aguggguguga	1140
ccuggacaccc	ggcaagacccc	ugggcggugaa	ccagcgggggc	gagcugugcg	ugcggggggcc	1200
gaugaucaau	agccggcuacg	ugaacacaccc	ggagggccacc	aacggccucca	ucgacaaaggaa	1260
ccggcuggcug	cacagcggggc	acauccgccua	cugggagcagag	gacgagcacu	ucuucaucug	1320
cgaaccggcug	aagucggcugaa	ucaaguuacaa	gggcuaccag	gugggcggccg	ccgagcuguga	1380
gagccauccug	cuccagccacc	ccaaacauucuu	cgaaccggccg	gugggccgggg	ugccgggacga	1440
cgaaccggccg	gagcugcccg	ccggcggugug	ggugcugggag	cacggcaga	ccaugacggaa	1500
gaaaggagau	gucgacucacg	ugggccagccc	ggugacccacc	gccaaagagcc	ugcggggggcg	1560
ccggcgguguc	guggacagag	ucccgaaaggg	ccugacccggg	aagcucgacg	cccggaagau	1620
ccggcggagau	cugaucaaggg	ccaaagaaagg	cggcagagau	ggcguguaag	acuauguuua	1680
agacugacua	gcccgaugggg	ccucccaaacg	ggccuccucc	ccuccucugc	accgagauua	1740
auuuuuuuuu	uuuuuuuuuu	uuuuuuuuuu	uuuuuuuuuu	uuuuuuuuuu	uuuuuuuuuu	1800
uuuuuuuuuu	uuuuuuuuuu	uuuuuuuuuu	uuuuuuuuuu	uuuuuuuuuu	uuuuuuuuuu	1841

<210> 52

<211> 1841

5 <212> RNA

<213> suni

<220>

<223> ppLuc(GC)-ag-A64-U30'ün mRNA sekansı

<400> 52

[illegible]

<210> 53

<211> 1857

<212> RNA

<213> suni

5 <220>

<223> ppLuc(GC)-ag-A64-SL'nin mRNA sekansı

<400> 53

gggagaaagc uugagggaugg aggacgccaa gaacaucaag aaggggcccg cgcuccuua	60
cccgcuggag gacggggaccg ccggcgagca gcuccacaag gccaugaagc gguacgccc	120
ggugccgggc acgaucgcu uacccgacgc ccacaucgag gucgacauca ccuacgcgga	180
guacuuogag augagcgugc gccuggcoga ggccaugaag cgguacggcc ugaacaccaa	240
ccaccggau cgggugugcu cggagaaacag ccugcaguu c ucaugcccg ugcuuggcgc	300

<400> 54

[illegible]

<210> 55

<211> 747

<212> RNA

<213> suni

<220>

<223> NY-ESO-1(GC)-ag-A64-C30'un mRNA sekansı

5 <400> 55

```

gggagaaagc uuaccuagca gggcgaaggc cgcggcacccg ggcggcuogac cggcgaacgoc      60
gacgggcccgc ggcggcccgccg caucccgccac ggcggcgccgc ggaacggcgccg cggcccgccgc      120
gagggcggccg ccaacggcccg ggcggggcccg cggggcgcccg ggcggcccgccg ggcggagccgc      180
cccggcgccgc ggcggcccgccg ggcggcccgccg ggcggcgcccg ccagcgccgcg ggaacggcgccg      240
ugccggcgccg ggcggcccgccg cccgggagagc cggcgcccgccg aguuuuuaccu ggcgaugccg      300
uucggcgccgc cgaugggagcc cgaugcgccgc cggcgggagcc ugccggcgccg cgcggcccgccg      360
cugcccgccg cggcgcgccg ccugagggag uuaccgggga ggcggcaaccu ccugagccauc      420
cggcgagccg ccggcgccga ccggcgagccg cagcgcuogca uccagcgccg ccuaccagcag      480
cugagcccgcc ugauugggau caccagggc uuaccggccg ugaucccgcc ccaagcccgcc      540
agcgcccgccg ggcggcgccg acuauguuua agacugacua gcccggauccg ccuaccagccg      600
ggcccgccgc ccccgccgc accgagauua auaaauaaua auaaauaaua auaaauaaua      660
aauaauaaua auaaauaaua auaaauaaua auaaauaauu ccccgcccgcc ccccgcccgcc      720
cccccgccgc ucuaagacaa uggaaau      747

```

<210> 56

<211> 761

<212> RNA

10 <213> suni

<220>

<223> NY-ESO-1(GC)-ag-A64-C30-histonSL'nin mRNA sekansı

<400> 56

ggtgagaaagc	uuaccauagca	gtcccgaggtgc	cgccggcacccg	gcgggcucgac	cgccgacccgc	60
gaccgggccccg	gcggccccggg	cauccccggac	ggccccggggcg	ggaaacggggg	gggccccgggc	120
gagggccggcg	ccaccggggcg	gctggggcccg	ctggggcgcccg	gcggcccccg	ggcgagcggtc	180
ccccggcgggg	ggcccccgcg	ggggccccac	ggcgggcgccg	ccagcggtccu	gaaacgggugc	240
ugcccgguugc	gcggcccccg	ccccggagagc	ctggcuccug	aguuucaaccu	ggccauugccg	300
uucggcgacc	cgauugaggtc	cgagcuggtcc	ctggcgaggtc	uggtccagga	cgcccgcccg	360
cugccccguac	cgggcgguuc	ccugaaaggag	uuacggguag	ggggcaacau	ccugaccauc	420
ctggcugaccg	ctggcgaccga	ctggcgagcug	cgacugugga	ucagcagcug	ccuccagcag	480
cugagccucg	ugauugugau	caccccagugc	uuccugcccg	uguuuccuggc	ccagccggccc	540
agccggccagc	gcggguagacc	acuaaguuaua	agacugacua	gccccgaggg	ccucccaacg	600
ggccccuccuc	ccuuccuugc	accgagauua	auaaaaaaaaa	aaaaaaaaaa	aaaaaaaaaa	660
aaaaaaaaaa	aaaaaaaaaa	aaaaaaaaaa	aaaaaaugca	uccccccccc	ccccccccc	720
ccccccccc	ccaaaggcuc	uuuucagagc	ccccaggaa	u		761

5 <210> 57

<211> 646

<212> RNA

<213> suni

<220>

10 <223> Survivin(GC)-ag-A64-C30-histonSL'nin mRNA sekansı

<400> 57

gggagaaagc	uuaccauagg	cgccccacc	cugcccgccg	ccuggcagcc	guuccucaag	60
gaccaccgca	ucucgacccu	caagaaacug	ccguuccug	agggcugcgc	guccaccgcc	120
gagcggaug	ccgagggccg	cuaauccac	ugccccaccg	agaaaggagc	ggaccuaggc	180
cagugcuuc	ucugcuuca	ggagcuggag	ggcugggagc	cgacgacga	cccgaucgag	240
gagcacaga	agcacagcag	cgucugcgc	uuccugagcg	ugaaagagca	guucgagga	300
cugacgcucg	gggaguuccu	gaagcuggac	cgggagcggg	ccaaagaaca	gaucgcgaa	360
gagaccaca	acaaagaa	ggaguuagag	gagaccggca	agaaaggugc	gcggggccauc	420
gagcagcug	ccgcacugga	cugaccacua	guuaaagac	ugacuaagcc	gaugggccuc	480
ccaaaggggc	cuccuccccu	ccuugcaccg	agauuaaua	aaaaaaaaa	aaaaaaaaa	540
aaaaaaaaa	aaaaaaaaa	aaaaaaaaa	aaaaaaaaa	auugcaucc	ccccccccc	600
ccccccccc	cccccccca	aggcuuuu	cagagccacc	agaaau		646

<210> 58

<211> 1813

<212> RNA

<213> suni

5 <220>

<223> MAGE-CI(GC)-ag-A64-C30-histonSL'nin mRNA sekans1

<400> 58

gggagaaagc uuaaccaugca guccccgcug caggggcgaagg aguuccagag cucccugcag	60
agccccgugu ccaucugcag cuccagcaccc cccuuccagcc ucccgcacag cuuucccgag	120
uccagccagc cccccccgga gggcccgugc cagagccccc ugcacucccc gcagagccccc	180
ccggaggggga ugcaacucca gagccccug cagucccccg agagcgcgcc cgaaggcgag	240
gacuccuca gcccgugca gaucucccag ucccgcgug agggggaggga cagccucucc	300
agccugcacu uccccaguc cccgccgag ugggaggaca gccugagccc ccuccacuu	360
ccccaguucc cggcccaggg cgaaggacu caguccagcc ugcagucccc cguaggauc	420

uqvcuccagdcu	cacacagagdcu	gucdcucuccdc	cagagdcuucdc	cgagagucuccc	cacagagdcgc	480
cccgaggggggc	cgcgcgacaguc	ccccucgacg	cgccccgugag	gcuuccuucuu	cagcuacacc	540
cugcgdcucdc	ucucugcacgag	cucdcacdgag	agdcocgcagag	gcocgcocgcg	ggcgccocgc	600
cagucucccggc	ugcacagagcc	cguucocagc	uucuccucca	gcacocucag	cucccucagc	660
cagucocagcc	cggugucocag	cucococguc	agcacccucca	gcucccgugag	cagagagcuc	720
cccgagagdc	ccucgacaguc	ccocgugaguc	agcucucucca	gcuccacagag	cucucuccgc	780
uucagcgaggg	agucacaguc	ccccgucgac	gagucacacc	gcuccacgcg	cacccugcug	840
gagucocgaca	gcucacocgc	cucgcagagc	cugagocgag	cgagagcccu	guucaccuac	900
acgcucgacg	agagaggggag	cagagcuggc	cggucuccgc	uccugagag	cagggugag	960
cagcccauca	cacagggccg	gagucgagcc	aacgucacuc	cccgcuacac	cggcucacuc	1020
cgggugaguc	ucocgacagc	gcgcgaguc	aucgagaguc	ucucggggag	cagccugcgc	1080
gagggggagcc	cgcagcaguc	cucgucuc	gugagacagc	uggagccuac	cagcgagggc	1140
ugcucugucc	acgagcaggg	gagagagccg	aacgcucgc	ucacccugag	ccuguccauc	1200
aucucacuca	agggcacuca	cgcagcggg	gagggucacuc	gggacgugc	cuccgggag	1260
ggcgugcgcgc	cgcgcgcgcg	gcacucgc	uucggggagc	cccgggagc	gcugaccaa	1320
gucugggguc	agggagcacu	cccgagagac	cgcgaggggc	ccacagcuc	ccgcccgcgc	1380
uacggaguc	ugggggggcc	cgcgcgccac	agcgagguc	ucagcgggag	ggggggggag	1440
uuccugggcg	ugcucagag	cagggucdc	aucacucuc	cgucacguc	cagggagcc	1500
cugagagagc	uggagggagc	ggccacggcc	aucacgaca	ccacgagc	cuccacggcc	1560
accgagagcgc	cguocagcuc	cugagagagc	ccagcucuc	ccagcgagug	accacuguu	1620
auaagagcug	cuaagcccg	ggcgucucc	aggggcucuc	cuccdcucuc	ugcaccgag	1680
uuauauauau	auauauauau	auauauauau	auauauauau	auauauauau	auauauauau	1740
auauauauau	gcaucucccc	ccccccccc	ccccccccc	ccccccccc	cucuuuucag	1800
agccaccaga	auu					1813

TARİFNAME İÇERİSİNDE ATIF YAPILAN REFERANSLAR

Başvuru sahibi tarafından atıf yapılan referanslara ilişkin bu liste, yalnızca okuyucunun yardımı içindir ve Avrupa Patent Belgesinin bir kısmını oluşturmaz. Her ne kadar referansların derlenmesine büyük önem verilmiş olsa da, hatalar veya eksiklikler engellenememektedir ve EPO bu bağlamda hiçbir sorumluluk kabul etmemektedir.

Tarifname içerisinde atıfta bulunulan patent dökümanları:

- WO 02098443 A [0021]
- WO 2007036366 A [0022]
- WO 2011069529 A1 [0023]
- WO 0112824 A [0051]
- EP 2012000674 W [0198]

10

Tarifnamede belirtilen patentleştirilmemiş literatür:

- MEYER, S., C. TEMME et al. Crit Rev Biochem Mol Biol, 2004, vol. 39 (4), 197-216 [0005]
- MICHEL, Y. M. ; D. PONCET et al. J Biol Chem, 2000, vol. 275 (41), 32268-76 [0006]
- DOMINSKI, Z.; W. F. MARZLUFF. Gene, 2007, vol. 396 (2), 373-90 [0007] [0011] [0039]
- DAVILA LOPEZ, M. ; SAMUELSSON, T. RNA, 2008, vol. 14 (1), 1-10 [0008] [0011] [0159] [0161]
- CHODCHOY, N. ; N. B. PANDEY et al. Mol Cell Biol, 1991, vol. 11 (1), 497-509 [0009]
- PANDEY, N. B. et al. Molecular and Cellular Biology, 1994, vol. 14 (3), 1709-1720 [0011]
- WILLIAMS, A. S. ; MARZLUFF, W. F. Nucleic Acids Research, 1995, vol. 23 (4), 654-662 [0011]
- AKASHI. Curr. Opin. Genet. Dev., 2001, vol. 11 (6), 660-666 [0100]
- HOLCIK et al. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 1997, vol. 94, 2410-2414 [0102]
- MANIATIS et al. Molecular Cloning: A Laboratory Manual. Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2001 [0103]
- LAI et al. Development, 1995, vol. 121, 2349-2360 [0106]
- Purification of PCR Products. MEZEI ; STORTS. PCR Technology: Current Innovation. CRC Press, 2001 [0106]
- Absorption, Circular Dichroism and ORD of Polypeptides. URRY et al. Modern Physical Methods in Biochemistry. Elsevier, 1985 [0114]
- KARLIN et al. PNAS USA, 1993, vol. 90, 5873-5877 [0116]
- ALTSCHUL et al. Nucleic Acids Res., 1997, vol. 25, 3389-3402 [0116]

- **SANCHEZ, R. ; W. F. MARZLUFF.** Mol Cell Biol, 2004, vol. 24 (6), 2513-25 [0011]
- **WHITELAW, E. et al.** Nucleic Acids Research, 1986, vol. 14 (17), 7059-7070 [0012]
- **PANDEY, N. B. ; MARZLUFF, W. F.** Molecular and Cellular Biology, 1987, vol. 7 (12), 4557-4559 [0012]
- **PANDEY, N. B. et al.** Nucleic Acids Research, 1990, vol. 18 (11), 3161-3170 [0012]
- **LUSCHER, B. et al.** Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 1985, vol. 82 (13), 4389-4393 [0013]
- **STAUBER, C. et al.** EMBO J, 1986, vol. 5 (12), 3297-3303 [0014]
- **WAGNER, E. J. et al.** Mol Cell, 2007, vol. 28 (4), 692-9 [0015]
- **GALLIE, D. R. ; LEWIS, N. J. ; MARZLUFF, W. F.** Nucleic Acids Research, 1996, vol. 24 (10), 1954-1962 [0016]
- **CAKMAKCI et al.** Molecular and Cellular Biology, 2008, vol. 28 (3), 1182-1194 [0159]
- **THISTED et al.** The Journal of Biological Chemistry, 2001, vol. 276 (20), 17484-17496 [0159]
- **MAKEYEV et al.** Genomics, 2000, vol. 67 (3), 301-316 [0159]
- **CHKHEIDZE et al.** Molecular and Cellular Biology, 1999, vol. 19 (7), 4572-4581 [0159]
- **BABENDURE et al.** RNA, 2006, vol. 12 (5), 851-861 [0159]

ŞEKİLLERDEKİ YAZILARIN ANLAMLARI

ŞEKİL 1

A = Sap 1

5 B = İlmik

C = Sap 2

ŞEKİL 22

D = saat

10 E = kontrol

F = ortalama

ŞEKİL 25

G = İn vivo lusiferaz ekspresyonu

15

ŞEKİL 26

H = Sayımlar

I = İzotip kontrolü

20 **ŞEKİL 27**

J = Tampon

K = uç nokta titeri

25

