

REIVINDICACIONES

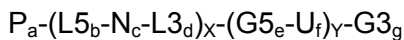
Se reivindica lo siguiente:

1. Una composición para la administración de un sistema de expresión de neoantígenos, que comprende:
 - 5 el sistema de expresión de neoantígenos, donde el sistema de expresión de neoantígenos comprende uno o más vectores, el uno o más vectores comprenden:
 - (a) una estructura principal de alfavirus de ARN, donde la estructura principal de alfavirus de ARN comprende:
 - 10 (i) al menos una secuencia promotora de nucleótidos, y
 - (ii) al menos una secuencia de poliadenilación (poli(A)); y
 - (b) un casete de neoantígeno, donde el casete de neoantígeno comprende:
 - (i) al menos una secuencia de ácido nucleico que codifica neoantígenos derivada de un tumor presente dentro de un sujeto, que comprende:
 - 15 (I) al menos una secuencia de ácido nucleico que codifican neoantígenos del MHC clase I específica del tumor y específica del sujeto derivada del tumor y que comprende:
 - (A) una secuencia de ácidos nucleicos que codifica el epítipo del MHC clase I con al menos una alteración que distingue a la secuencia peptídica codificada con respecto a la secuencia peptídica correspondiente codificada por una secuencia de ácidos nucleicos de tipo salvaje, y
 - 20 (B) opcionalmente una secuencia enlazadora 5', y
 - (C) opcionalmente una secuencia enlazadora 3';
 - (ii) opcionalmente, una segunda secuencia promotora de nucleótidos unida de forma operativa con la secuencia de ácido nucleico que codifica neoantígenos; y
 - (iii) opcionalmente, al menos una secuencia de ácidos nucleicos que codifica el antígeno del MHC
 - 25 clase II;
 - (iv) opcionalmente, al menos una secuencia de ácido nucleico que codifica un enlazador aminoácido GPGPG (SEQ ID NO:56); y
 - (v) opcionalmente, al menos una segunda secuencia de poli(A), donde la segunda secuencia de poli(A) es una secuencia de poli(A) natural o una secuencia de poli(A) exógena con respecto al alfavirus.
 - 30 2. Una composición para la administración de un sistema de expresión de neoantígenos, que comprende:
 - el sistema de expresión de neoantígenos,
 - donde el sistema de expresión de neoantígenos comprende uno o más vectores,
 - el uno o más vectores comprenden:

- (a) una estructura principal de alfavirus de ARN, donde la estructura principal de alfavirus de ARN comprende la secuencia de ácido nucleico establecida en la SEQ ID NO:6, donde la secuencia de estructura principal de alfavirus de ARN comprende una secuencia promotora de nucleótidos 26S y una secuencia de poli(A), donde la secuencia promotora 26S es endógena con respecto a la estructura principal de alfavirus de ARN, y donde la secuencia de poli(A) es endógena con respecto a la estructura principal de alfavirus de ARN; y
- (b) un casete de neoantígenos integrado entre la secuencia promotora de nucleótidos 26S y la secuencia de poli(A), donde el casete de neoantígenos comprende:
- (i) al menos una secuencia de ácido nucleico que codifica neoantígenos derivada de un tumor presente dentro de un sujeto, que comprende:
 - (I) al menos 10 secuencias de ácidos nucleicos que codifican neoantígenos del MHC clase I específicas del tumor y específicas del sujeto, enlazadas de manera lineal entre sí, cada una de las cuales comprende:
 - (A) una secuencia de ácidos nucleicos que codifica el epítipo del MHC clase I con al menos una alteración que distingue a la secuencia peptídica codificada de la secuencia peptídica correspondiente codificada por una secuencia de ácidos nucleicos de tipo salvaje, donde la secuencia de ácidos nucleicos que codifica el epítipo del MHC I codifica un epítipo del MHC clase I con una longitud de 7-15 aminoácidos,
 - (B) una secuencia enlazadora 5', donde la secuencia enlazadora 5' codifica una secuencia de ácido del extremo N natural del epítipo del MHC I, y donde la secuencia enlazadora 5' codifica un péptido con una longitud de al menos 3 aminoácidos,
 - (C) una secuencia enlazadora 3', donde la secuencia enlazadora 3' es una secuencia de ácidos nucleicos de extremo N natural del epítipo del MHC I, y donde la secuencia enlazadora 3' codifica un péptido con una longitud de al menos 3 aminoácidos, y
 - donde el casete de neoantígeno se une de forma operativa con la secuencia promotora de nucleótidos 26S, donde cada una de las secuencias de ácidos nucleicos que codifican el neoantígeno del MHC clase I codifica un polipéptido con una longitud de entre 13 y 25 aminoácidos, y donde cada extremo 3' de cada secuencia de ácidos nucleicos que codifica el neoantígeno del MHC clase I se encuentra enlazado al extremo 5' de la secuencia de ácidos nucleicos que codifica el neoantígeno del MHC clase I con la excepción de la secuencia de ácidos nucleicos que codifica el neoantígeno del MHC clase I final dentro del casete de neoantígeno; y
 - (ii) al menos dos secuencias de ácidos nucleicos que codifican el antígeno del MHC clase II que comprenden:
 - (I) una secuencia del MHC clase II de PADRE (SEQ ID NO:48),

- (II) una secuencia del MHC clase II de toxoide tetánico (SEQ ID NO:46),
- (III) una primera secuencia enlazadora GPGPG que enlaza la secuencia del MHC clase II de PADRE y la secuencia del MHC clase II de toxoide tetánico,
- (IV) una segunda secuencia de ácido nucleico que codifica un enlazador aminoácido GPGPG que enlaza el extremo 5' de las dos o más secuencias de ácidos nucleicos que codifican el antígeno del MHC clase II a al menos 20 secuencias de ácidos nucleicos que codifican el neoantígeno del MHC clase I específicas del tumor y específicas del sujeto,
- (V) opcionalmente, una tercera secuencia de ácido nucleico que codifica un enlazador aminoácido GPGPG en el extremo 3' de las dos o más secuencias de ácidos nucleicos que codifican el antígeno del MHC clase II

3. La composición de la reivindicación 1, donde una secuencia ordenada de cada elemento del casete de neoantígeno se describe en la fórmula, de 5' a 3', que comprende:



donde P comprende la segunda secuencia promotora de nucleótidos, donde $a = 0$ o 1 .

N comprende una de las secuencias de ácidos nucleicos que codifica el epítipo del MHC clase I, donde $c = 1$.

L5 comprende la secuencia enlazadora 5', donde $b = 0$ o 1 ,

L3 comprende la secuencia enlazadora 3', donde $d = 0$ o 1 ,

G5 comprende una de al menos una secuencia de ácido nucleico que codifica un enlazador aminoácido GPGPG, donde $e = 0$ o 1 ,

G3 comprende una de la al menos una secuencia de ácido nucleico que codifica un enlazador aminoácido GPGPG, donde $g = 0$ o 1 ,

U comprende una de la o las secuencias de ácidos nucleicos que codifican el antígeno del MHC clase II, donde $f = 1$,

X = de 1 a 400, donde para cada X la N_c correspondiente es una secuencia de ácidos nucleicos que codifica el epítipo, y

Y = 0, 1 o 2, donde para cada Y la U_f correspondiente es una secuencia de ácido nucleico que codifica un antígeno.

4. La composición de la reivindicación 3, donde para cada X la N_c correspondiente es una secuencia de ácidos nucleicos que codifica el epítipo del MHC clase I distinta.

5. La composición de la reivindicación 3 o 4, donde para cada Y, la U_f correspondiente es una secuencia de ácidos nucleicos que codifica el antígeno del MHC clase II.

6. La composición de cualquiera de las reivindicaciones 3-5, donde
 $a = 0$, $b = 1$, $d = 1$, $e = 1$, $g = 1$, $h = 1$, $X = 20$, $Y = 2$,
la al menos una secuencia promotora de nucleótidos es una secuencia promotora de nucleótidos 26S individual proporcionada por la estructura principal de alfavirus de ARN,
- 5 la al menos una secuencia de poliadenilación poli(A) es una secuencia de poli(A) de al menos 100 nucleótidos A consecutivos proporcionada por la estructura principal de alfavirus de ARN,
- cada N codifica un epítipo del MHC clase I con una longitud de 7-15 aminoácidos.
L5 es una secuencia enlazadora 5' natural que codifica la secuencia de aminoácido del extremo N natural
10 del epítipo del MHC I, y donde la secuencia enlazadora 5' codifica un péptido con una longitud de al menos 3 aminoácidos,
L3 es una secuencia enlazadora 3' natural que codifica una secuencia de aminoácido del extremo natural del epítipo del MHC I, y donde la secuencia enlazadora 3' codifica un péptido con una longitud de al menos 3 aminoácidos,
- 15 U es cada una de una secuencia de PADRE clase II y una secuencia del MHC clase II de toxoide tetánico, la estructura principal de alfavirus de ARN es la secuencia que se establece en la SEQ ID NO:6, y cada una de las secuencias de ácidos nucleicos que codifican el neoantígeno del MHC clase I codifica un polipéptido con una longitud de entre 13 y 25 aminoácidos.
7. La composición de cualquiera de las reivindicaciones anteriores, donde la composición
20 comprende, además, un vehículo de administración de nanopartículas.
8. La composición de la reivindicación 7, donde el vehículo de administración de nanopartículas es una nanopartícula lipídica (LNP).
9. La composición de la reivindicación 8, donde la LNP comprende aminolípidos ionizables.
10. La composición de la reivindicación 9, donde los aminolípidos ionizables comprenden moléculas
25 similares a MC3 (dilinoleimetil-4-dimetilaminobutirato).
11. La composición de cualquiera de las reivindicaciones 7-10, donde el vehículo de administración de nanopartículas encapsula el sistema de expresión de neoantígenos.
12. La composición de la reivindicación 8, que comprende, además, una pluralidad de LNP, donde las LNP comprenden:
- 30 el sistema de expresión de neoantígenos;
un lípido catiónico;
un lípido no catiónico; y
un lípido conjugado que inhibe la agregación de LNP, donde al menos alrededor de 95 % de las LNP en la pluralidad de LNP:

(a) tienen una morfología no lamelar; o

(b) son electrodensas.

13. La composición de la reivindicación 12, donde el lípido no catiónico es una mezcla de (1) un fosfolípido y (2) colesterol o un derivado de colesterol.

5 14. La composición de la reivindicación 12 o 13, donde el lípido conjugado que inhibe la agregación de las LNP es un conjugado de polietilenglicol (PEG)-lípido.

15. La composición de la reivindicación 14, donde el conjugado de PEG-lípido se selecciona del grupo que consiste en un conjugado de PEG-diacylglicerol (PEG-DAG), un conjugado de PEG-dialquioxipropilo (PEG-DAA), un conjugado de PEG-fosfolípido, un conjugado de PEG-ceramida (PEG-Cer), y una mezcla de estos.

16. La composición de la reivindicación 15, donde el conjugado de PEG-DAA se selecciona del grupo que consiste en un conjugado de PEG-didecioxipropilo (C_{10}), un conjugado de PEG-dilaurioxipropilo (C_{12}), un conjugado de PEG-dimiristioxipropilo (C_{14}), un conjugado de PEG-dipalmitioxipropilo (C_{16}), un conjugado de PEG-diestearioxipropilo (C_{18}) y una mezcla de estos.

15 17. La composición de cualquiera de las reivindicaciones 12-16, donde la morfología no lamelar de las LNP comprende una estructura de fase cúbica o hexagonal inversa (H_{II}).

18. La composición de la reivindicación 12-17, donde el lípido catiónico comprende de alrededor de 10 % molar a alrededor de 50 % molar de los lípidos totales presentes en las LNP.

19. La composición de cualquiera de las reivindicaciones 12-17, donde el lípido catiónico comprende de alrededor de 20 % molar a alrededor de 50 % molar de los lípidos totales presentes en las LNP.

20. La composición de cualquiera de las reivindicaciones 12-17, donde el lípido catiónico comprende de alrededor de 20 % molar a alrededor de 40 % molar de los lípidos totales presentes en las LNP.

21. La composición de cualquiera de las reivindicaciones 12-20, donde el lípido no catiónico comprende de alrededor de 10 % molar a alrededor de 60 % molar de los lípidos totales presentes en las LNP.

22. La composición de cualquiera de las reivindicaciones 12-20, donde el lípido no catiónico comprende de alrededor de 20 % molar a alrededor de 55 % molar de los lípidos totales presentes en las LNP.

23. La composición de cualquiera de las reivindicaciones 12-20, donde el lípido no catiónico comprende de alrededor de 25 % molar a alrededor de 50 % molar de los lípidos totales presentes en las LNP.

24. La composición de cualquiera de las reivindicaciones 12-23, donde el lípido conjugado comprende de alrededor de 0,5 % molar a alrededor de 20 % molar de los lípidos totales presentes en las LNP.

25. La composición de cualquiera de las reivindicaciones 12-23, donde el lípido conjugado comprende de alrededor de 2 % molar a alrededor de 20 % molar de los lípidos totales presentes en las LNP.
26. La composición de cualquiera de las reivindicaciones 12-23, donde el lípido conjugado
5 comprende de alrededor de 1,5 % molar a alrededor de 18 % molar de los lípidos totales presentes en las LNP.
27. La composición de cualquiera de las reivindicaciones 12-26, donde más del 95 % de las LNP tienen una morfología no lamelar.
28. La composición de cualquiera de las reivindicaciones 12-27, donde más del 95 % de las LNP son
10 electrodensas.
29. La composición de cualquiera de las reivindicaciones 8-28, que comprende, además, una pluralidad de LNP, donde las LNP comprenden:
un lípido catiónico que comprende de 50 % molar a 65 % molar de los lípidos totales presentes en las LNP;
15 un lípido conjugado que inhibe la agregación de LNP que comprende de 0,5 % molar a 2 % molar de los lípidos totales presente en las LNP; y
un lípido no catiónico que comprende:
(a) ya sea una mezcla de un fosfolípido y colesterol o un derivado de este, donde el fosfolípido comprende de alrededor de 4 % molar a 10 % molar de los lípidos totales presentes en las LNP y el
20 colesterol o un derivado de este comprende de alrededor 30 % molar a 40 % molar de los lípidos totales presentes en las LNP;
(b) ya sea una mezcla de un fosfolípido y colesterol o un derivado de este, donde el fosfolípido comprende de alrededor de 3 % molar a 15 % molar de los lípidos totales presentes en las LNP y el colesterol o un derivado de este comprende de alrededor 30 % molar a 40 % molar de los lípidos totales
25 presentes en las LNP; o
(c) hasta 49,5 % molar de los lípidos totales presentes en las LNP y comprende una mezcla de un fosfolípido y colesterol o un derivado de este, donde el colesterol o derivado de este colesterol de 30 % molar a 40 % molar de los lípidos totales presentes en las LNP.
30. La composición de cualquiera de las reivindicaciones 8-28, que comprende, además, una
30 pluralidad de LNP, donde las LNP comprenden:
un lípido catiónico que comprende de 50 % molar a 85 % molar de los lípidos totales presentes en las LNP;
un lípido conjugado que inhibe la agregación de LNP que comprende de 0,5 % molar a 2 % molar de los lípidos totales presente en las LNP; y

un lípido catiónico que comprende de 13 % molar a 49,5 % molar de los lípidos totales presentes en las LNP.

31. La composición de la reivindicación 29, donde el fosfolípido comprende dipalmitoilfosfatidilcolina (DPPC), distearoilfosfatidilcolina (DSPC), o una mezcla de estos.

5 32. La composición de la reivindicación 29 o 30, donde el lípido conjugado comprende un conjugado de polietilenglicol (PEG)-lípido.

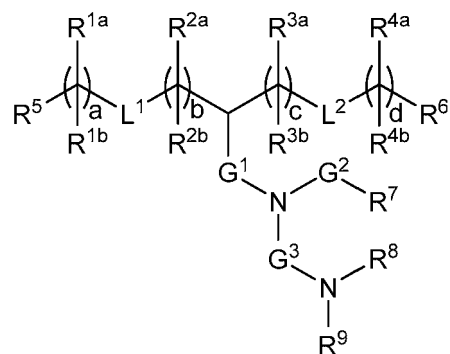
33. La composición de la reivindicación 32, donde el conjugado PEG-lípido comprende un conjugado PEG-diacilglicerol (PEG-DAG), un conjugado PEG-dialquioxipropilo (PEG-DAA), o una mezcla de estos.

10 34. La composición de la reivindicación 33, donde el conjugado de PEG-DAA comprende un conjugado de PEG-dimistiriloxipropilo (PEG-DMA), un conjugado de PEG-diesteariloxipropilo (PEG-DSE), o una mezcla de estos.

35. La composición de cualquiera de las reivindicaciones 32-34, donde la parte de PEG del conjugado tiene un peso molecular promedio de alrededor de 2000 Dalton.

15 36. La composición de cualquiera de las reivindicaciones 29-35, donde el lípido conjugado comprende de 1 % molar a 2 % molar de los lípidos totales presentes en las LNP.

37. La composición de cualquiera de las reivindicaciones 8-36, donde la LNP comprende un compuesto que tiene una estructura de la Fórmula I:



I

20 o una sal, tautómero, profármaco o estereoisómero farmacéuticamente aceptable de este, donde:
cada uno de L¹ y L² son independientemente -O(C=O)-, -(C=O)O-, -C(=O)-, -O-, -S(O)_x-, -S-S-, -C(=O)S-, -SC(=O)-, -R^aC(=O)-, -C(=O)R^a-, -R^aC(=O)R^a-, -OC(=O)R^a-, -R^aC(=O)O- o un enlace directo;

G¹ es alquileno Ci-C₂, - (C=O)-, -O(C=O)-, -SC(=O)-, -R^aC(=O)- o un enlace directo:

-C(=O)-, -(C=O)O-, -C(=O)S-, -C(=O)R^a- o un enlace directo;

25 G es alquileno Ci-C₆;

R^a es H o alquilo C₁-C₁₂;

R^{1a} y R^{1b} son, en cada aparición, independientemente ya sea: (a) H o alquilo C₁-C₁₂; o (b) R^{1a} es H o alquilo C₁-C₁₂, y R^{1b} junto con el átomo de carbono al cual está unido tomados juntos con un R^{1b} adyacente

y el átomo de carbono al cual está unido forman un enlace doble carbono-carbono;

R^{2a} y R^{2b} son, en cada aparición, independientemente ya sea: (a) H o alquilo C_1-C_{12} ; o (b) R^{2a} es H o alquilo C_1-C_{12} , y R^{2b} junto con el átomo de carbono al cual está unido tomados juntos con un R^{2b} adyacente y el átomo de carbono al cual está unido forman un enlace doble carbono-carbono;

- 5 R^{3a} y R^{3b} son, en cada aparición, independientemente ya sea (a): H o alquilo C_1-C_{12} ; o (b) R^{3a} es H o alquilo C_1-C_{12} , y R^{3b} junto con el átomo de carbono al cual está unido tomados juntos con un R adyacente y el átomo de carbono al cual está unido forman un enlace doble carbono-carbono;

R^{4a} y R^{4b} son, en cada aparición, independientemente ya sea: (a) H o alquilo C_1-C_{12} ; o (b) R^{4a} es H o alquilo C_1-C_{12} , y R^{4b} junto con el átomo de carbono al cual está unido tomados juntos con un R^{4b} adyacente y el átomo de carbono al cual está unido forman un enlace doble carbono-carbono;

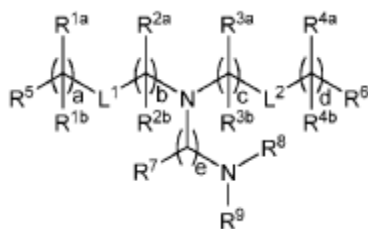
- 10 cada uno de R^5 y R^6 es independientemente hidrógeno o metilo;

R^7 es alquilo C_4-C_{20} ;

cada uno de R^8 y R^9 es independientemente alquilo C_1-C_{12} ; o R^8 y R^9 , junto con el átomo de nitrógeno al que están unidos, forman un anillo heterocíclico de 5, 6 o 7 miembros;

- 15 cada uno de a, b, c y d es independientemente un entero seleccionado de 1 a 24; y x es 0, 1 o 2.

38. La composición de cualquiera de las reivindicaciones 8-36, donde la LNP comprende un compuesto que tiene una estructura de la Fórmula II:



II

- 20 o una sal, tautómero, profármaco o estereoisómero farmacéuticamente aceptable de este, donde:

cada uno de L^1 y L^2 es independientemente $-O(C=O)-$, $-(C=O)O-$ o un enlace doble carbono-carbono;

R^{1a} y R^{1b} son, en cada aparición, independientemente ya sea (a) H o alquilo C_1-C_{12} o (b) R^{1a} es H o alquilo C_1-C_{12} , y R^{1b} junto con el átomo de carbono al cual está unido tomados juntos con un R^{1b} adyacente y el átomo de carbono al cual está unido forman un enlace doble carbono-carbono;

- 25 R^{2a} y R^{2b} son, en cada aparición, independientemente ya sea (a) H o alquilo C_1-C_{12} ; o (b) R^{2a} es H o alquilo C_1-C_{12} , y R^{2b} junto con el átomo de carbono al cual está unido tomados juntos con un R^{2b} adyacente y el átomo de carbono al cual está unido forman un enlace doble carbono-carbono;

R^{3a} y R^{3b} son, en cada aparición, independientemente ya sea (a) H o alquilo C_1-C_{12} ; o (b) R^{3a} es H o alquilo C_1-C_{12} , y R^{3b} junto con el átomo de carbono al cual está unido tomados juntos con un R^{3b}

- 30 adyacente y el átomo de carbono al cual está unido forman un enlace doble carbono-carbono;

R^{4a} y R^{4b} son, en cada aparición, independientemente ya sea (a) H o alquilo C₁-C₁₂; o (b) R^{4a} es H o alquilo C₁-C₁₂, y R^{4b} junto con el átomo de carbono al cual está unido tomados juntos con un R^{4b} adyacente y el átomo de carbono al cual está unido forman un enlace doble carbono-carbono;

cada uno de R⁵ y R⁶ es independientemente metilo o cicloalquilo;

5 R⁷ es, en cada aparición, independientemente, H o -alquilo C₁-C₁₂;

cada uno de R⁸ y R⁹ es independientemente alquilo C₁-C₁₂ no sustituido; o R⁸ y R⁹, junto con el átomo de nitrógeno al que están unidos, forman un anillo heterocíclico de 5, 6 o 7 miembros que comprende un átomo de nitrógeno;

cada uno de a y d es independientemente un entero de 0 a 24; cada uno de b y c es independientemente

10 un entero seleccionado de 1 a 24; y e es 1 o 2,

siempre que:

al menos uno de R^{1a}, R^{2a}, R^{3a} o R^{4a} sea alquilo C₁-C₁₂, o al menos uno de L¹ o L² sea -O(C=O)- o -(C=O)O-; y

R^{1a} y R^{1b} no sean isopropilo cuando a es 6 o n-butilo cuando a es 8.

15 39. La composición de las reivindicaciones 37 o 39, comprende, además, uno o más excipientes que comprenden un lípido neutro, un esteroide y un lípido conjugado con polímero.

40. La composición de la reivindicación 39, donde el lípido neutro comprende al menos uno de 1,2-Distearoil-*sn*-glicerol-3-fosfolina (DSPC), 1,2-Dipalmitoil-*sn*-glicerol-3-fosfolina (DPPC), 1,2-Dimiristoil-*sn*-glicerol-3-fosfolina (DMPC), 1-Palmitoil-2-oleoil-*sn*-glicerol-3-fosfolina (POPC), 1,2-
20 dioleoil-*sn*-glicerol-3-fosfolina (DOPC) y 1,2-Dioleoil-*sn*-glicerol-3-fosfoetanolamina (DOPE).

41. La composición de la reivindicación 40, donde el lípido neutro es DSPC.

42. La composición de cualquiera de las reivindicaciones 39-41, donde la relación molar del compuesto con respecto al lípido neutro oscila de alrededor de 2:1 a alrededor de 8:1.

43. La composición de cualquiera de las reivindicaciones 39-42, donde el esteroide es colesterol.

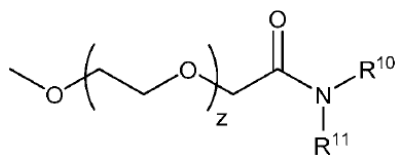
25 44. La composición de la reivindicación 43, donde la relación molar del compuesto con respecto al colesterol oscila de alrededor de 2:1 a 1:1.

45. La composición de cualquiera de las reivindicaciones 39-44, donde el lípido conjugado con polímero es un lípido pegilado.

30 46. La composición de la reivindicación 45, donde la relación molar del compuesto con respecto al lípido pegilado oscila de alrededor de 100:1 a alrededor de 25:1.

47. La composición de las reivindicaciones 45 o 46, donde el lípido pegilado es PEG-DAG, un PEG polietileno (PEG-PE), un PEG-succinil-diacylglicerol (PEG-S-DAG), PEG-cer o un PEG dialquioxipropilcarbamato.

48. La composición de las reivindicaciones 45 o 46, donde el lípido pegilado tiene la siguiente



III

5 cada uno de R¹⁰ y R¹¹ es independientemente una cadena de alquilo recta o ramificada, saturada o no saturada que contiene de 10 a 30 átomos de carbono, donde la cadena de alquilo se interrumpe opcionalmente con uno o más enlaces de éster; y

z tiene un valor promedio que oscila de 30 a 60.

50. La composición de cualquiera de las reivindicaciones 48 o 49, donde el promedio de z es alrededor de 45.

52. La composición de la reivindicación 51, donde las estructuras que no son bicapa tienen un diámetro de entre 60 nm y 120 nm.

53. La composición de la reivindicación 51, donde las estructuras que no son bicapa tienen un diámetro de alrededor de 70 nm, alrededor de 80 nm, alrededor de 90 nm o alrededor de 100 nm.

54. La composición de cualquiera de las reivindicaciones 7-53, donde el vehículo de administración
20 de nanopartículas tiene un diámetro de alrededor de 100 nm.

55. La composición de cualquiera de las reivindicaciones 1, 3-5 o 7-54, donde el casete de neoantígeno se integra entre la al menos una secuencia promotora de nucleótidos y la al menos una secuencia de poli(A).

56. La composición de cualquiera de las reivindicaciones 1, 3-5 o 7-55, donde la al menos una
25 secuencia promotora de nucleótidos se une de forma operativa con la secuencia de ácido nucleico que
codifica neoantígenos.

57. La composición de cualquiera de las reivindicaciones 1, 3-5 o 7-56, donde el uno o más vectores comprende uno o más vectores de ARN de cadena +.

58. La composición de la reivindicación 57, donde el uno o más vectores de ARN de cadena +
30 comprende un casquete 5' 7-metilguanosina (m7g).

59. La composición de la reivindicación 57 o 58, donde el uno o más vectores de ARN de cadena + se produce mediante transcripción *in vitro*.

60. La composición de cualquiera de las reivindicaciones 1, 3-5 o 7-59, donde el uno o más vectores son autorreplicantes dentro de una célula de mamífero.
61. La composición de cualquiera de las reivindicaciones 1, 3-5 o 7-60, donde la estructura principal de alfavirus de ARN comprende al menos una secuencia de nucleótidos de un virus Aura, un virus Fort Morgan, un virus de encefalitis equina venezolana, un virus del río Ross, un virus del bosque Semliki, un virus Sindbis o un virus Mayaro.
62. La composición de cualquiera de las reivindicaciones 1, 3-5 o 7-60, donde la estructura principal de alfavirus de ARN comprende al menos una secuencia de nucleótidos de un virus de encefalitis equina venezolana.
63. La composición de la reivindicación 61 o 62, donde la estructura principal de alfavirus de ARN comprende al menos secuencias para la amplificación mediada por proteínas no estructurales, una secuencia promotora 26S, una secuencia de poli(A), un gen de la proteína no estructural 1 (nsP1), un gen de nsP2, un gen de nsP3 y un gen de nsP4, codificados por la secuencia de nucleótidos del virus Aura, el virus Fort Morgan, el virus de la encefalitis equina venezolana, el virus del río Ross, el virus del bosque Semliki, el virus Sindbis o el virus Mayaro.
64. La composición de la reivindicación 61 o 62, donde la estructura principal de alfavirus de ARN comprende al menos secuencias para la amplificación mediada por proteínas no estructurales, una secuencia promotora 26S y una secuencia de poli(A) codificadas por la secuencia de nucleótidos del virus Aura, el virus Fort Morgan, el virus de la encefalitis equina venezolana, el virus del río Ross, el virus del bosque Semliki, el virus Sindbis o el virus Mayaro.
65. La composición de la reivindicación 63 o 64, donde las secuencias para la amplificación mediada por proteínas no estructurales se seleccionan del grupo que consiste en: una UTR 5' de alfavirus, un CSE 51-nt, un CSE 24-nt, una secuencia promotora subgenómica 26S, un CSE 19-nt y una UTR 3' de alfavirus, o combinaciones de estos.
66. La composición de la cualquiera de las reivindicaciones 63-65, donde la estructura principal de alfavirus de ARN no codifica cápside de proteínas estructurales de virión, E2 y E1.
67. La composición de la reivindicación 66, donde el casete de antígenos se inserta en lugar de las proteínas estructurales de virión dentro de la secuencia de nucleótidos del virus Aura, el virus Fort Morgan, el virus de la encefalitis equina venezolana, el virus del río Ross, el virus del bosque Semliki, el virus Sindbis o el virus Mayaro.
68. La composición de la reivindicación 61 o 62, donde el virus de encefalitis equina venezolana comprende la secuencia que de la SEQ ID NO:3 o la SEQ ID NO:5.

69. La composición de la reivindicación 61 o 62, donde el virus de encefalitis equina venezolana comprende la secuencia de las SEQ ID NO:3 o SEQ ID NO:5 que comprenden además una delección entre los pares de bases 7544 y 11175.
70. La composición de la reivindicación 69, donde la estructura principal de alfavirus de ARN comprende la secuencia establecida en la SEQ ID NO:6 o la SEQ ID NO:7.
71. La composición de la reivindicación 69 o 70, donde el casete de neoantígeno se inserta en la posición 7544 para reemplazar la delección entre los pares de base 7544 y 11175 como se establece en la secuencia de la SEQ ID NO:3 o la SEQ ID NO:5.
72. La composición de la reivindicación 67-71, donde la inserción del casete de neoantígeno proporciona la transcripción de un ARN policistrónico que comprende los genes nsP1-4 y la al menos una secuencia de ácido nucleico que codifica el antígeno, donde los genes nsP1-4 y la al menos una secuencia de ácido nucleico que codifica el antígeno están en marcos abierto de lectura separados.
73. La composición de cualquiera de las reivindicaciones 1, 3-5 o 7-72, donde la al menos una secuencia promotora de nucleótidos es la secuencia promotora de nucleótidos 26S natural codificada por la estructura principal de alfavirus de ARN.
74. El método de cualquiera de las reivindicaciones 1, 3-5, o 7-72, donde la al menos una secuencia promotora de nucleótidos es un promotor de ARN exógeno.
75. La composición de cualquiera de las reivindicaciones 1, 3-5 o 7-74, donde la segunda secuencia promotora de nucleótidos es una secuencia promotora de nucleótidos 26S.
76. La composición de cualquiera de las reivindicaciones 1, 3-5 o 7-74, donde la segunda secuencia promotora de nucleótidos comprende múltiples secuencias promotoras de nucleótidos 26S, donde cada secuencia promotora de nucleótidos 26S proporciona la transcripción de uno o más marcos abiertos de lectura separados.
77. La composición de cualquiera de las reivindicaciones anteriores, donde cada uno del uno o más vectores tienen un tamaño de al menos 300 nt.
78. La composición de cualquiera de las reivindicaciones anteriores, donde cada uno del uno o más vectores tienen un tamaño de al menos 1 kb.
79. La composición de cualquiera de las reivindicaciones anteriores, donde cada uno del uno o más vectores tienen un tamaño de 2 kb.
80. La composición de cualquiera de las reivindicaciones anteriores, donde cada uno del uno o más vectores tienen un tamaño menor que 5 kb.
81. La composición de cualquiera de las reivindicaciones anteriores, donde al menos una de la al menos una secuencia de ácidos nucleicos que codifican el neoantígeno codifica una secuencia de polipéptidos o parte de esta que se presenta por el MHC clase I en la célula tumoral.

82. La composición de cualquiera de las reivindicaciones 1, 3-5 o 7-81, donde las secuencias de ácidos nucleicos que codifican el antígeno se enlazan cada una directamente entre sí.
83. La composición de cualquiera de las reivindicaciones 1, 3-5 o 7-82, donde al menos una de la al menos una secuencia de ácidos nucleicos que codifican el antígeno se enlaza a una secuencia de ácidos nucleicos que codifica el antígeno distinta con una secuencia de ácido nucleico que codifica un enlazador.
84. La composición de la reivindicación 83, donde el enlazador enlaza dos secuencias del MHC clase I o una secuencia del MHC clase I a una secuencia del MHC clase II.
85. La composición de la reivindicación 84, donde el enlazador se selecciona dentro del grupo que consiste en: (1) residuos de glicina consecutivos, con una longitud de al menos 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 o 10 residuos; (2) residuos de alanina consecutivos, con una longitud de al menos 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 o 10 residuos; (3) dos residuos de arginina (RR); (4) alanina, alanina, tirosina (AAY); (5) una secuencia de consenso con una longitud de al menos 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 o 10 residuos de aminoácidos que es procesada de manera eficiente por un proteasoma de un mamífero; y (6) una o más secuencias naturales que flanquean el antígeno que derivan de la proteína cognada de origen y que tienen una longitud de al menos 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20 o 2-20 residuos de aminoácidos.
86. La composición de la reivindicación 83, donde el enlazador enlaza dos secuencias del MHC clase II o una secuencia del MHC clase II a una secuencia del MHC clase I.
87. La composición de la reivindicación 86, donde el enlazador comprende la secuencia GP GPG.
88. La composición de cualquiera de las reivindicaciones 1, 3-5 o 7-87, donde al menos una secuencia de la al menos una secuencia de ácido nucleico que codifica el antígeno se enlaza, de manera operativa o directa, a una secuencia separada o contigua que mejora la expresión, la estabilidad, el tráfico, el procesamiento y la presentación de células y/o la inmunogenicidad de la al menos una secuencia de ácido nucleico que codifica el antígeno.
89. La composición de la reivindicación 88, donde la secuencia separada o contigua comprende al menos una de: una secuencia de ubiquitina, una secuencia de ubiquitina modificada para aumentar el direccionamiento hacia el proteasoma (p. ej., la secuencia de ubiquitina contiene una sustitución de Gly por Ala en la posición 76), una secuencia señal de inmunoglobulina (p. ej., IgK), una secuencia principal de histocompatibilidad clase I, una proteína de la membrana asociada a los lisosomas (LAMP)-1, una proteína de la membrana asociada a los lisosomas de las células dendríticas humanas, y una secuencia principal de histocompatibilidad clase II; donde opcionalmente la secuencia de ubiquitina modificada para aumentar el direccionamiento hacia el proteasoma es A76.
90. La composición de cualquiera de las reivindicaciones anteriores, donde al menos una de la al menos una secuencia de ácidos nucleicos que codifica el neoantígeno codifica una secuencia de

polipéptidos o parte de esta que tiene una mayor afinidad de unión con respecto a su alelo del MHC correspondiente con respecto a la secuencia de ácidos nucleicos de tipo salvaje correspondiente traducida.

91. La composición de cualquiera de las reivindicaciones anteriores, donde al menos una de la al menos una secuencia de ácidos nucleicos que codifica el neoantígeno codifica una secuencia de polipéptidos o parte de esta que tiene una mayor estabilidad de unión con respecto a su alelo del MHC correspondiente con respecto a la secuencia de ácidos nucleicos de tipo salvaje correspondiente traducida.

92. La composición de cualquiera de las reivindicaciones anteriores, donde al menos una de la al menos una secuencia de ácidos nucleicos que codifica el neoantígeno codifica una secuencia de polipéptidos o parte de esta que tiene una mayor probabilidad de presentación en su alelo del MHC correspondiente con respecto a la secuencia de ácidos nucleicos de tipo salvaje correspondiente traducida.

93. La composición de cualquiera de las reivindicaciones anteriores, donde la o las alteraciones comprenden una mutación puntual, una mutación de desplazamiento de marco, una mutación sin desplazamiento de marco, una mutación de eliminación, una mutación de inserción, una variante de corte y empalme, una reorganización genómica o un antígeno sometido a corte y empalme generado por el proteasoma.

94. La composición de cualquiera de las reivindicaciones anteriores, donde el tumor se selecciona dentro del grupo que consiste en: cáncer pulmonar, melanoma, cáncer de mama, cáncer de ovario, cáncer de próstata, cáncer renal, cáncer gástrico, cáncer de colon, cáncer testicular, cáncer de cabeza y cuello, cáncer pancreático, cáncer de vejiga, cáncer cerebral, linfoma de linfocitos B, leucemia mielógena aguda, leucemia linfoblástica aguda del adulto, leucemia mielógena crónica, leucemia linfocítica crónica y leucemia linfocítica de linfocitos T, cáncer pulmonar no microcítico y cáncer pulmonar microcítico.

95. La composición de cualquiera de las reivindicaciones 1, 3-5 o 7-94, donde la al menos una secuencia de ácido nucleico que codifica el neoantígeno comprende al menos 2-10, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 o 10 secuencias de ácidos nucleicos.

96. La composición de cualquiera de las reivindicaciones 1, 3-5 o 7-94, donde la al menos una secuencia de ácido nucleico que codifica el neoantígeno comprende al menos 11-20, 15-20, 11-100, 11-200, 11-300, 11-400, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20 o hasta 400 secuencias de ácidos nucleicos.

97. La composición de cualquiera de las reivindicaciones 1, 3-5 o 7-94, donde la al menos una secuencia de ácido nucleico que codifica el neoantígeno comprende al menos 2-400 secuencia de ácido nucleico y donde al menos dos de las secuencias de ácido nucleico que codifican el neoantígeno

codifican secuencias de polipéptidos o partes de estas que se presentan por MHC clase I en la superficie de la célula tumoral.

98. La composición de la reivindicación 2 o 6, donde al menos dos de las secuencias de ácidos nucleicos que codifican el neoantígeno codifican secuencias de polipéptidos o partes de estas son presentadas por el MHC clase I sobre la superficie de la célula tumoral.

99. La composición de cualquiera de las reivindicaciones anteriores donde, cuando se administra al sujeto y se traduce, al menos uno de los neoantígenos codificados por la al menos una secuencia de ácido nucleico que codifica el neoantígeno se presenta en células presentadoras de antígenos, lo cual produce una respuesta inmunitaria que se dirige a al menos uno de los neoantígenos sobre la superficie de la célula tumoral.

100. La composición de cualquiera de las reivindicaciones anteriores, donde la al menos una secuencia de ácidos nucleicos que codifica el neoantígeno, cuando se administra al sujeto y se traduce, al menos uno de los neoantígenos del MHC clase I o clase II se presenta en células presentadoras de antígenos que producen una respuesta inmunitaria dirigida a al menos uno de los neoantígenos sobre la superficie de la célula tumoral, y donde opcionalmente la expresión de cada una de la al menos una secuencia de ácidos nucleicos que codifica el neoantígeno es impulsada por el o los promotores.

101. La composición de cualquiera de las reivindicaciones 1, 3-5 o 7-100, donde cada secuencia de ácidos nucleicos que codifica el neoantígeno del MHC clase I codifica una secuencia de polipéptidos con una longitud de entre 8 y 35 aminoácidos, opcionalmente una longitud de 9-17, 9-25, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34 o 35 aminoácidos.

102. La composición de cualquiera de las reivindicaciones 1, 3-5 o 7-101, donde la o las secuencias de ácidos nucleicos que codifican el antígeno del MHC clase II se encuentran presentes.

103. La composición de cualquiera de las reivindicaciones 1, 3-5 o 7-101, donde la o las secuencias de ácidos nucleicos que codifican el antígeno del MHC clase II se encuentran presentes y comprenden al menos una secuencia de ácidos nucleicos que codifica el neoantígeno del MHC clase II que comprende al menos una alteración que distingue a la secuencia peptídica codificada de la secuencia peptídica correspondiente codificada por una secuencia de ácidos nucleicos de tipo salvaje.

104. La composición de cualquiera de las reivindicaciones 1, 3-5 o 7-103, donde la o las secuencias de ácidos nucleicos que codifican el antígeno del MHC clase II tienen una longitud de 12-20, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20 o 20-40.

105. La composición de cualquiera de las reivindicaciones 1, 3-5 o 7-104, donde la o las secuencias de ácidos nucleicos que codifican el antígeno del MHC clase II se encuentran presentes y comprenden al menos una secuencia de ácidos nucleicos que codifica el antígeno del MHC clase II universal, donde opcionalmente la o las secuencias universales comprenden toxoide tetánico y/o PADRE.

106. La composición de cualquiera de las reivindicaciones 1, 3-5 o 7-105, donde la al menos una secuencia promotora de nucleótidos o la segunda secuencia promotora de nucleótidos son inducibles.
107. La composición de cualquiera de las reivindicaciones 1, 3-5 o 7-105, donde la al menos una secuencia promotora de nucleótidos o la segunda secuencia promotora de nucleótidos son no inducibles.
- 5 108. La composición de cualquiera de las reivindicaciones 1, 3-5 o 7-107, donde la al menos una secuencia de poli(A) comprende una secuencia de poli(A) natural para el alfavirus.
109. La composición de cualquiera de las reivindicaciones 1, 3-5 o 7-107, donde la al menos una secuencia de poli(A) comprende una secuencia de poli(A) exógena para el alfavirus.
- 10 110. La composición de cualquiera de las reivindicaciones 1, 3-5 o 7-109, donde la al menos una secuencia de poli(A) se une de forma operativa a al menos una de la al menos una secuencia de ácido nucleico que codifica el antígeno.
111. La composición de cualquiera de las reivindicaciones 1, 3-5 o 7-110, donde la al menos una secuencia de poli(A) tiene al menos 20, al menos 30, al menos 40, al menos 50, al menos 60, al menos 70, al menos 80 o al menos 90 nucleótidos A consecutivos.
- 15 112. La composición de cualquiera de las reivindicaciones 1, 3-5 o 7-110, donde la al menos una secuencia de poli(A) tiene al menos 100 nucleótidos A consecutivos.
113. La composición de cualquiera de las reivindicaciones anteriores, donde el casete de neoantígeno comprende además al menos uno de: una secuencia de intrón, una secuencia del elemento regulador postraducción del virus de hepatitis de la marmota (WPRE), una secuencia de entrada interna al
- 20 ribosoma (IRES), una secuencia de nucleótidos que codifica una secuencia de péptidos autoescindible 2A, una secuencia de nucleótidos que codifica un sitio de escisión de furina o una secuencia en la región no codificante 5' o 3' conocida por mejorar la eficiencia de traducción, estabilidad o exportación nuclear del ARNm que se enlaza de manera operativa a al menos una de la al menos una secuencia de ácido nucleico que codifica un antígeno.
- 25 114. La composición de cualquiera de las reivindicaciones anteriores, donde el casete de neoantígeno comprende además un gen indicador, lo cual incluye, de modo no taxativo, una proteína fluorescente verde (GFP), una variante de GFP, fosfatasa alcalina secretada, luciferasa o una variante de la luciferasa, o un péptido o epítipo detectable.
115. La composición de la reivindicación 114, donde el péptido o epítipo detectable se selecciona del
- 30 grupo que consiste en una etiqueta HA, una etiqueta Flag, una etiqueta His o una etiqueta V5.
116. La composición de cualquiera de las reivindicaciones anteriores, donde el uno o más vectores comprenden además una o más secuencias de ácidos nucleicos que codifican al menos un modulador inmunitario.
117. La composición de la reivindicación 116, donde el modulador inmunitario es un anticuerpo anti-

CTLA4 o un fragmento de unión al antígeno de este, un anticuerpo anti-PD-1 o un fragmento de unión al antígeno de este, un anticuerpo anti-PD-L1 o un fragmento de unión al antígeno de este, un anticuerpo anti-4-1BB o un fragmento de unión al antígeno de este, o un anticuerpo anti-OX-40 o un fragmento de unión al antígeno de este.

- 5 118. La composición de la reivindicación 117, donde el anticuerpo o fragmento de unión al antígeno de este es un fragmento Fab, un fragmento Fab', un Fv monocatenario (scFv), un anticuerpo de dominio simple (sdAb) como uno solo específico o múltiples especificidades enlazadas entre sí (p. ej., dominios de anticuerpo de camélido) o un anticuerpo monocatenario de longitud completa (p. ej., IgG de longitud completa con las cadenas pesada y ligera enlazadas mediante un enlazador flexible).
- 10 119. La composición de la reivindicación 117 o 118, donde las secuencias de cadena pesada y ligera del anticuerpo son una secuencia contigua separada por una secuencia de autoescisión tal como 2A o IRES; o las secuencias de cadena pesada y ligera del anticuerpo están enlazadas mediante un enlazador flexible tal como residuos de glicina consecutivos.
120. La composición de la reivindicación 116, donde el modulador inmunitario es una citocina.
- 15 121. La composición de la reivindicación 120, donde la citocina al menos una de IL-2, IL-7, IL-12, IL-15 o IL-21 o variantes de cada una de estas.
122. La composición de cualquiera de las reivindicaciones 1, 3-5 o 7-121, donde la al menos una secuencia de ácido nucleico que codifica un neoantígeno del MHC clase I se selecciona mediante la realización de las siguientes etapas:
- 20 (a) obtener datos de secuenciación de nucleótidos tumorales del genoma completo, transcriptoma y/o exoma del tumor, donde los datos de secuenciación de nucleótidos tumorales se usan para obtener datos que representen secuencias peptídicas de cada uno de un conjunto de neoantígenos;
- (b) ingresar la secuencia peptídica de cada neoantígeno en un modelo de presentación para generar un conjunto de probabilidades numéricas de que uno o más alelos del MHC presenten cada uno de los
- 25 neoantígenos en la superficie celular tumoral del tumor, donde el conjunto de probabilidades numéricas se ha identificado al menos en función de datos de espectrometría de masas; y
- (c) seleccionar un subconjunto del conjunto de neoantígenos en función del conjunto de probabilidades numéricas para generar un conjunto de neoantígenos seleccionados que se usen para generar la al menos una secuencia de ácidos nucleicos que codifica el neoantígeno del MHC clase I.
- 30 123. La composición de la reivindicación 2 o 6, donde cada una de las secuencias de ácidos nucleicos que codifican el epítipo del MHC clase I se seleccionan mediante la realización de las siguientes etapas:
- (a) obtener datos de secuenciación de nucleótidos tumorales del genoma completo, transcriptoma y/o exoma del tumor, donde los datos de secuenciación de nucleótidos tumorales se usan para obtener datos que representen secuencias peptídicas de cada uno de un conjunto de neoantígenos;

- (b) ingresar la secuencia peptídica de cada neoantígeno en un modelo de presentación para generar un conjunto de probabilidades numéricas de que uno o más alelos del MHC presenten cada uno de los neoantígenos en la superficie celular tumoral del tumor, donde el conjunto de probabilidades numéricas se ha identificado al menos en función de datos de espectrometría de masas; y
- 5 (c) seleccionar un subconjunto del conjunto de neoantígenos en función del conjunto de probabilidades numéricas para generar un conjunto de neoantígenos seleccionados que se usen para generar las al menos 20 secuencias de ácidos nucleicos que codifican el neoantígeno del MHC clase I.
124. La composición de la reivindicación 122, donde una cantidad del conjunto de neoantígenos seleccionados es de 2-20.
- 10 125. El vector de la reivindicación 122-124, donde el modelo de presentación representa dependencia entre:
- (a) la presencia de un par de alelos de MHC de un tipo particular y un aminoácido particular en una posición particular de una secuencia peptídica; y
- (b) la probabilidad de la presentación sobre la superficie de la célula tumoral, por parte del alelo del
- 15 MHC particular del par, de esa secuencia peptídica que comprende el aminoácido particular en la posición particular.
126. La composición de la reivindicación 122-125, donde la selección del conjunto de neoantígenos seleccionados comprende seleccionar neoantígenos con una mayor probabilidad de presentarse sobre la superficie de la célula tumoral con respecto a neoantígenos no seleccionados en función del modelo
- 20 de presentación.
127. La composición de la reivindicación 122-126, donde la selección del conjunto de neoantígenos seleccionados comprende seleccionar neoantígenos con mayor probabilidad de poder inducir una respuesta inmunitaria específica para el tumor en el sujeto con respecto a neoantígenos no seleccionados en función del modelo de presentación.
- 25 128. La composición de la reivindicación 122-127, donde la selección del conjunto de neoantígenos seleccionados comprende seleccionar neoantígenos con una mayor probabilidad de poder ser presentados a linfocitos T no activados por parte de células presentadoras de antígenos (APC) con respecto a neoantígenos no seleccionados en función del modelo de presentación, donde opcionalmente la APC es una célula dendrítica (DC).
- 30 129. La composición de la reivindicación 122-128, donde la selección del conjunto de neoantígenos seleccionados comprende seleccionar neoantígenos con una menor probabilidad de someterse a inhibición a través de una tolerancia central o periférica con respecto a neoantígenos no seleccionados en función del modelo de presentación.
130. La composición de la reivindicación 122-129, donde la selección del conjunto de neoantígenos

seleccionados comprende seleccionar neoantígenos con menor probabilidad de poder inducir una respuesta autoinmunitaria al tejido normal en el sujeto con respecto a neoantígenos no seleccionados en función del modelo de presentación.

131. La composición de la reivindicación 122-130, donde se obtienen datos de secuenciación de nucleótidos del exoma o transcriptoma mediante la realización de una secuenciación en el tejido tumoral.

132. La composición de la reivindicación 131, donde la secuenciación es secuenciación de nueva generación (NGS) o cualquier estrategia de secuenciación masiva en paralelo.

133. La composición de cualquiera de las reivindicaciones anteriores, donde el casete de neoantígeno comprende secuencias de epítomos de unión formadas mediante secuencias adyacentes en el casete de neoantígeno.

134. La composición de la reivindicación 133, donde al menos una o cada secuencia de epítomos de unión tiene una afinidad de más de 500 nM con respecto al MHC.

135. La composición de las reivindicaciones 133 o 134, donde cada secuencia de epítomos de unión no es propia.

136. La composición de cualquiera de las reivindicaciones anteriores, donde el casete de neoantígeno no codifica una secuencia de ácidos nucleicos del epítomo del MHC clase I o clase II no terapéutico que comprenda una secuencia de ácidos nucleicos de tipo salvaje traducida, donde se prevé que el epítomo no terapéutico se presente en un alelo del MHC del sujeto.

137. La composición de la reivindicación 136, donde la secuencia del epítomo del MHC clase I o clase II previsto no terapéutico es una secuencia de epítomos de unión formada por secuencias adyacentes en el casete de neoantígeno.

138. La composición de las reivindicaciones 133-137, donde la predicción en función de probabilidades de presentación generadas mediante el ingreso de secuencias de los epítomos no terapéuticos en un modelo de presentación.

139. La composición de cualquiera de las reivindicaciones 133-138, donde se determina un orden de la al menos una secuencia de ácidos nucleicos que codifica el antígeno en el casete de neoantígeno mediante una serie de etapas que comprenden:

(a) generar un conjunto de secuencias del casete de neoantígeno candidatas correspondientes a diferentes órdenes de las múltiples secuencias de ácidos nucleicos que codifican el antígeno;

(b) determinar, para cada casete de neoantígeno candidata, un puntaje de presentación en función de la presentación de los epítomos no terapéuticos en la secuencia del casete de neoantígeno candidata; y

(c) seleccionar una secuencia de casete candidata asociada a un puntaje de presentación por debajo de un umbral predeterminado como la secuencia del casete de neoantígeno para una vacuna de

neoantígeno.

140. Una composición farmacéutica que comprende la composición de cualquiera de las reivindicaciones anteriores y un portador farmacéuticamente aceptable.

5 141. La composición de la reivindicación 140, donde la composición comprende además un adyuvante.

142. La composición farmacéutica de la reivindicación 140 o 141, donde la composición comprende además un modulador inmunitario.

10 143. La composición farmacéutica de la reivindicación 142, donde el modulador inmunitario es un anticuerpo anti-CTLA4 o un fragmento de unión al antígeno de este, un anticuerpo anti-PD-1 o un fragmento de unión al antígeno de este, un anticuerpo anti-PD-L1 o un fragmento de unión al antígeno de este, un anticuerpo anti-4-1BB o un fragmento de unión al antígeno de este, o un anticuerpo anti-OX-40 o un fragmento de unión al antígeno de este.

15 144. Una secuencia de nucleótidos aislada o un conjunto de secuencias de nucleótidos aisladas que comprende el casete de neoantígeno de cualquiera de las reivindicaciones de composición anteriores y uno o más elementos obtenidos a partir de la secuencia de la SEQ ID NO: 3 o SEQ ID NO:5, donde opcionalmente el uno o más elementos se seleccionan dentro del grupo que consiste en las secuencias necesarias para la amplificación mediada por proteínas no estructurales, la secuencia promotora de nucleótidos 26S, la secuencia de poli(A) y los genes nsP1-4 de la secuencia que se indica en la SEQ ID NO:3 o SE ID NO:5, y donde opcionalmente la secuencia de nucleótidos es ADNc.

20 145. La secuencia de nucleótidos aisladas de la reivindicación 144, donde la secuencia o conjunto de secuencias de nucleótidos aisladas comprende el casete de neoantígeno de cualquiera de las reivindicaciones de composición anteriores insertado en la posición 7544 de las secuencias establecidas en las SEQ ID NO:6 o SEQ ID NO:7.

25 146. La secuencia de nucleótidos aislada de la reivindicación 144 o 145, que comprende, además: una secuencia promotora de nucleótidos de polimerasa de ARN T7 o SP6 5' del uno o más elementos obtenidos de la secuencia de la SEQ ID NO:3 o la SEQ ID NO:5; y opcionalmente, uno o más sitios de restricción 3' de la secuencia de poli(A).

30 147. La secuencia de nucleótidos aisladas de la reivindicación 144, donde el casete de neoantígeno de cualquiera de las reivindicaciones de composición anteriores se inserta en la posición 7563 de la SEQ ID NO:8 o SEQ ID NO:9.

148. Un vector o conjunto de vectores que comprende la secuencia de nucleótidos de las reivindicaciones 144-147.

149. Una célula aislada que comprende la secuencia de nucleótidos o conjunto de secuencias de nucleótidos aisladas de las reivindicaciones 144-148, donde opcionalmente la célula es una célula BHK-

21, CHO, HEK293 o variantes de esta, 911, HeLa, A549, LP-293, PER.C6 o AE1-2a.

150. Un kit que comprende la composición de cualquiera de las reivindicaciones de composición anteriores e instrucciones de uso.

5 151. Un método para tratar un sujeto con cáncer, donde el método comprende administrar al sujeto la composición de cualquiera de las reivindicaciones de composición anteriores o la composición farmacéutica de cualquiera de las reivindicaciones 140-143.

152. El método de la reivindicación 151, donde la al menos una secuencia de ácido nucleico que codifica un neoantígeno del MHC clase I derivada de un tumor se deriva del tumor del sujeto con cáncer.

10 153. El método de la reivindicación 151, donde la al menos una secuencia de ácido nucleico que codifica un neoantígeno del MHC clase I no se deriva del tumor del sujeto con cáncer.

154. Un método para inducir una respuesta inmunitaria en un sujeto, donde el método comprende administrarle al sujeto la composición de cualquiera de las reivindicaciones de composición anteriores o la composición farmacéutica de cualquiera de las reivindicaciones 140-143.

15 155. El método de las reivindicaciones 151-154, donde el vector o la composición se administra por vía intramuscular (IM), intradérmica (ID), subcutánea (SC) o intravenosa (IV).

156. El método de las reivindicaciones 151-154, donde la composición se administra por vía intramuscular.

20 157. El método de cualquiera de las reivindicaciones 151-156, donde el método comprende, además, la administración de uno o más moduladores inmunitarios, opcionalmente donde el modulador inmunitario se administra antes, de manera simultánea o después de la administración de la composición o composición farmacéutica.

25 158. El método de la reivindicación 157, donde el uno o más moduladores inmunitarios se seleccionan del grupo que consiste en: un anticuerpo anti-CTLA4 o un fragmento de unión al antígeno de este, un anticuerpo anti-PD-1 o un fragmento de unión al antígeno de este, un anticuerpo anti-PD-L1 o un fragmento de unión al antígeno de este, un anticuerpo anti-4-1BB o un fragmento de unión al antígeno de este, o un anticuerpo anti-OX-40 o un fragmento de unión al antígeno de este.

159. El método de la reivindicación 157 o 158, donde el modulador inmunitario se administra por vía intravenosa (IV), intramuscular (IM), intradérmica (ID) o subcutánea (SC).

30 160. El método de la reivindicación 159, donde la administración subcutánea se encuentra cerca del sitio de administración de la composición farmacéutica o en proximidad estrecha con respecto a uno o más ganglios linfáticos de drenaje del vector o de la composición.

161. El método de cualquiera de las reivindicaciones 151-160, que comprende además administrar al sujeto una segunda composición de vacuna.

162. El método de la reivindicación 161, donde la segunda composición de vacuna se administra antes

de la administración de la composición o la composición farmacéutica de cualquiera de las reivindicaciones 151-160.

163. El método de la reivindicación 161, donde la segunda composición de vacuna se administra después de la administración de la composición o la composición farmacéutica de cualquiera de las reivindicaciones 151-160.

164. El método de la reivindicación 162 o 163, donde la segunda composición de vacuna es igual que la composición o la composición farmacéutica de cualquiera de las reivindicaciones 151-160.

165. El método de la reivindicación 162 o 163, donde la segunda composición de vacuna es diferente de la composición o la composición farmacéutica de cualquiera de las reivindicaciones 151-160.

166. El método de la reivindicación 165, donde la segunda composición de vacuna comprende un vector de adenovirus de chimpancé que codifica al menos una secuencia de ácidos nucleicos que codifica el neoantígeno.

167. El método de la reivindicación 166, donde la al menos una secuencia de ácidos nucleicos que codifica el neoantígeno codificada por el vector de adenovirus de chimpancé es igual que la al menos una secuencia de ácidos nucleicos que codifica el neoantígeno de cualquiera de las reivindicaciones de composición anteriores.

168. Un método de fabricación del uno o más vectores de cualquiera de las reivindicaciones de composición anteriores, donde el método comprende:

(a) obtener una secuencia de ADN linealizada que comprende la estructura principal de alfavirus de ARN y el casete de neoantígeno;

(b) transcripción *in vitro* de la secuencia de ADN linealizada mediante la adición de la secuencia de ADN linealizada en una reacción de transcripción *in vitro* que contiene todos los componentes necesarios para transcribir la secuencia de ADN linealizada en ARN, opcionalmente, que comprende, además, la adición *in vitro* del casquete m7g al ARN resultante; y

(c) aislar el uno o más vectores a partir de la reacción de transcripción *in vitro*.

169. El método de fabricación de la reivindicación 168, donde la secuencia de ADN linealizada se genera mediante la linealización de una secuencia de plásmido de ADN o mediante amplificación mediante el uso de PCR.

170. El método de fabricación de la reivindicación 169, donde la secuencia plasmídica de ADN se genera mediante el uso de recombinación bacteriana o síntesis de ADN de genoma completo o síntesis de ADN de genoma completo con amplificación del ADN sintetizado en células bacterianas.

171. El método de fabricación de la reivindicación 168, donde el aislamiento del uno o más vectores a partir de la reacción de transcripción *in vitro* implica uno o más de extracción de fenol cloroformo, purificación basada en columna de sílice o métodos de purificación de ARN similares.

172. Un método para elaborar una composición de cualquiera de las reivindicaciones de composición anteriores para la administración del sistema de expresión de neoantígenos, donde el método comprende:

(a) proporcionar componentes para el vehículo de administración de nanopartículas;

5 (b) proporcionar el sistema de expresión de neoantígenos; y

(c) proporcionar condiciones suficientes para que el vehículo de administración de nanopartículas y el sistema de expresión de neoantígenos produzcan la composición para administración del sistema de expresión de neoantígenos.

173. El método de fabricación de la reivindicación 172, donde las condiciones se proporcionan mediante
10 mezcla microfluídica.