

REIVINDICACIONES

1. Una molécula de ácido nucleico que comprende una primera repetición terminal invertida (ITR) y una segunda ITR que flanquean un casete genético que comprende una secuencia de polinucleótidos heteróloga, en donde la primera ITR y/o la segunda ITR comprende una secuencia de nucleótidos al menos aproximadamente 75%, al menos aproximadamente 80%, al menos aproximadamente 85%, al menos aproximadamente 90%, al menos aproximadamente 95%, al menos aproximadamente 96%, al menos aproximadamente 97%, al menos aproximadamente 98%, al menos aproximadamente 99%, o 100% idéntica a una secuencia de nucleótidos expuesta en SEQ ID NO: 180, 181, 183, 184, 185, 186, 187 o 188, o un derivado funcional de la misma.
2. La molécula de ácido nucleico de la reivindicación 1, en donde opcionalmente:
la primera ITR comprende la secuencia de nucleótidos expuesta en SEQ ID NO: 180 y la segunda ITR comprende la secuencia de nucleótidos expuesta en SEQ ID NO: 181;
la primera ITR comprende la secuencia de nucleótidos expuesta en SEQ ID NO: 183 y la segunda ITR comprende la secuencia de nucleótidos expuesta en SEQ ID NO: 184;
la primera ITR comprende la secuencia de nucleótidos expuesta en SEQ ID NO: 185 y la segunda ITR comprende la secuencia de nucleótidos expuesta en SEQ ID NO: 186;
la primera ITR comprende la secuencia de nucleótidos expuesta en SEQ ID NO: 187 y la segunda ITR comprende la secuencia de nucleótidos expuesta en SEQ ID NO: 188; y/o
la primera ITR y la segunda ITR son complementos inversos entre sí.

3. La molécula de ácido nucleico de la reivindicación 1 o 2, que comprende además un promotor, opcionalmente en donde:
- el promotor está ubicado 5' con respecto a la secuencia de polinucleótidos heteróloga;
 - el promotor es un promotor específico de tejido;
 - el promotor impulsa la expresión de la secuencia de polinucleótidos heteróloga en un órgano seleccionado entre músculo, sistema nervioso central (SNC), sistema ocular, hígado, corazón, riñón, páncreas, pulmones, piel, vejiga, tracto urinario, o cualquier combinación de los mismos;
 - el promotor impulsa la expresión de la secuencia de polinucleótidos heteróloga en hepatocitos, células endoteliales, células de músculo cardíaco, células de músculo esquelético, células sinusoidales, neuronas aferentes, neuronas eferentes, interneuronas, células gliales, astrocitos, oligodendrocitos, microglía, células ependimarias, células epiteliales de pulmón, células de Schwann, células satélite, células fotorreceptoras, células del ganglio retiniano, o cualquier combinación de las mismas; y/o
 - el promotor se selecciona del grupo que consiste en un promotor de tiretina de ratón (mTTR), un promotor de factor VIII humano endógeno (F8), un promotor de alfa-1-antitripsina humana (hAAT), un promotor mínimo de albúmina humana, un promotor de albúmina de ratón, un promotor de tristetraprolina (TTP), un promotor CASI, un promotor CAG, un promotor de citomegalovirus (CMV), α 1-antitripsina (AAT), creatina quinasa muscular (MCK), cadena pesada alfa de miosina (α MHC), mioglobina (MB), desmina (DES), SPc5-12, 2R5Sc5-12, dMCK, tMCK, y un promotor de fosfoglicerato quinasa (PGK).
4. La molécula de ácido nucleico de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en donde opcionalmente:
- la secuencia de polinucleótidos heteróloga comprende además una secuencia intrónica, en donde opcionalmente:

la secuencia intrónica está ubicada 5' con respecto a la secuencia de polinucleótidos heteróloga;

la secuencia intrónica está ubicada 3' con respecto al promotor;

la secuencia intrónica comprende una secuencia intrónica sintética;
y/o

la secuencia intrónica comprende SEQ ID NO: 115 o 192;

la secuencia de polinucleótidos heteróloga codifica un factor de coagulación, un factor de crecimiento, una hormona, una citocina, un anticuerpo, un fragmento del mismo, o cualquier combinación de los mismos, en donde opcionalmente:

la secuencia de polinucleótidos heteróloga codifica un factor de crecimiento seleccionado del grupo que consiste en adrenomedulina (AM), angiopoyetina (Ang), factor de motilidad autocrino, una proteína morfogenética ósea (BMP) (p. ej. BMP2, BMP4, BMP5, BMP7), un miembro de la familia del factor neurotrófico ciliar (p. ej., factor neurotrófico ciliar (CNTF), factor inhibidor de leucemia (LIF), interleucina-6 (IL-6)), un factor estimulante de colonias (p. ej., factor estimulante de colonias de macrófagos (m-CSF), factor estimulante de colonias de granulocitos (G-CSF), factor estimulante de colonias de granulocitos-macrófagos (GM-CSF)), un factor de crecimiento epidérmico (EGF), una efrina (p. ej., efrina A1, efrina A2, efrina A3, efrina A4, efrina A5, efrina B1, efrina B2, efrina B3), eritropoyetina (EPO), un factor de crecimiento de fibroblastos (FGF) (p. ej., FGF1, FGF2, FGF3, FGF4, FGF5, FGF6, FGF7, FGF8, FGF9, FGF10, FGF11, FGF12, FGF13, FGF14, FGF15, FGF16, FGF17, FGF18, FGF19, FGF20, FGF21, FGF22, FGF23), somatotropina bovina fetal (FBS), un miembro de la familia de GDNF (p. ej., factor neurotrófico derivado de línea celular glial (GDNF), neurturina, persefina, artemina), factor de diferenciación del crecimiento-9 (GDF9), factor de crecimiento de hepatocitos (HGF), factor de crecimiento derivado de hepatoma (HDGF), insulina, factores de crecimiento de tipo insulínico

(p. ej., factor de crecimiento de tipo insulínico-1 (IGF-1) o IGF-2, una interleucina (IL) (p. ej., IL-1, IL-2, IL-3, IL-4, IL-5, IL-6, IL-7), factor de crecimiento de queratinocitos (KGF), factor estimulante de la migración (MSF), proteína estimulante de macrófagos (MSP o proteína de tipo factor de crecimiento de hepatocitos (HGFLP)), miostatina (GDF-8), una neurregulina (p. ej., neurregulina 1 (NRG1), NRG2, NRG3, NRG4), una neurotrofina (p. ej., factor neurotrófico derivado de cerebro (BDNF), factor de crecimiento nervioso (NGF), una neurotrofina-3 (NT-3), NT-4, factor de crecimiento placentario (PGF), factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF), renalasa (RNLS), factor de crecimiento de células T (TCGF), trombopoyetina (TPO), un factor de crecimiento transformante (p. ej., factor de crecimiento transformante alfa ($\text{TGF-}\alpha$), $\text{TGF-}\beta$, factor de necrosis tumoral-alfa ($\text{TNF-}\alpha$), y factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF), y cualquier combinación de los mismos;

la secuencia de polinucleótidos heteróloga codifica una hormona;

la secuencia de polinucleótidos heteróloga codifica una citocina; o

en donde la secuencia de polinucleótidos heteróloga codifica un anticuerpo o un fragmento del mismo;

la secuencia de polinucleótidos heteróloga codifica un gen seleccionado entre distrofina ligada a X, MTM1 (miotubularina), tirosina hidroxilasa, AADC, ciclohidrolasa, SMN1, FXN (frataxina), GUCY2D, RS1, CFH, HTRA, ARMS, CFB/CC2, CNGA/CNGB, Prf65, ARSA, PSAP, IDUA (MPS I), IDS (MPS II), PAH, GAA (alfa-glucosidasa ácida), y cualquier combinación de los mismos;

la secuencia de polinucleótidos heteróloga codifica un microARN (miARN), en donde opcionalmente el miARN regula por disminución la expresión de un gen diana seleccionado entre SOD1, HTT, RHO, y cualquier combinación de los mismos; y/o

la secuencia de polinucleótidos heteróloga tiene codones optimizados, en donde opcionalmente la secuencia de polinucleótidos heteróloga tiene codones optimizados para la expresión en un ser humano.

5. La molécula de ácido nucleico de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en donde opcionalmente:
- el casete genético comprende además un elemento regulador post-transcripcional, en donde opcionalmente:
 - el elemento regulador post-transcripcional está ubicado 3' con respecto a la secuencia de polinucleótidos heteróloga; y/o
 - el elemento regulador post-transcripcional comprende un elemento regulador post-transcripcional del virus de la hepatitis de marmota mutado (WPRE), un sitio de unión a microARN, una secuencia de direccionamiento nuclear de ADN, o cualquier combinación de los mismos, en donde opcionalmente el sitio de unión a microARN comprende un sitio de unión a miR142-3p;
 - el casete genético comprende además una secuencia de cola de poli(A) 3' UTR, en donde opcionalmente la secuencia de cola de poli(A) 3'UTR se selecciona del grupo que consiste en poli(A) de bGH, poli(A) de actina, poli(A) de hemoglobina, y cualquier combinación de las mismas, opcionalmente la secuencia de cola de poli(A) 3'UTR comprende poli(A) de bGH;
 - en donde el casete genético comprende además una secuencia potenciadora, en donde opcionalmente la secuencia potenciadora está ubicada entre la primera ITR y la segunda ITR;
 - el casete genético comprende un ácido nucleico de hebra sencilla; y/o
 - el casete genético comprende un ácido nucleico de doble hebra.
6. La molécula de ácido nucleico de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, en donde la molécula de ácido nucleico comprende de 5' a 3': la primera ITR, el casete genético, y la segunda ITR; en donde el casete genético comprende una secuencia promotora específica de tejido, una secuencia intrónica, la secuencia de polinucleótidos heteróloga, un elemento regulador post-transcripcional, y una secuencia de cola de poli(A) 3' UTR, en donde opcionalmente el casete genético comprende de 5' a 3': una secuencia promotora específica de tejido, una secuencia intrónica, la secuencia de

polinucleótidos heteróloga, un elemento regulador post-transcripcional, y una secuencia de cola de poli(A) 3' UTR, en donde opcionalmente:

- (a) la secuencia promotora específica de tejido comprende un promotor TTT;
- (b) el intrón es un intrón sintético;
- (c) el elemento regulador post-transcripcional comprende WPRE; y
- (d) la secuencia de cola de poli(A) 3'UTR comprende bGHpA.

7. La molécula de ácido nucleico de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, en donde la secuencia de polinucleótidos heteróloga codifica un factor de coagulación seleccionado del grupo que consiste en factor I (FI), factor II (FII), factor III (FIII), factor IV (FVI), factor V (FV), factor VI (FVI), factor VII (FVII), factor VIII (FVIII), factor IX (FIX), factor X (FX), factor XI (FXI), factor XII (FXII), factor XIII (FVIII), factor de Von Willebrand (VWF), precalicreína, cininógeno de alto peso molecular, fibronectina, antitrombina III, cofactor de heparina II, proteína C, proteína S, proteína Z, inhibidor de proteasa relacionada con proteína Z (ZPI), plasminógeno, alfa 2-antiplasmina, activador de plasminógeno tisular (tPA), uroquinasa, inhibidor del activador de plasminógeno-1 (PAI-1), inhibidor del activador de plasminógeno-2 (PAI2), y cualquier combinación de los mismos, en donde opcionalmente el factor de coagulación es FVIII, en donde opcionalmente el FVIII comprende FVIII maduro de longitud completa, en donde opcionalmente el FVIII comprende una secuencia de aminoácidos al menos aproximadamente 70%, al menos aproximadamente 75%, al menos aproximadamente 80%, al menos aproximadamente 85%, al menos aproximadamente 90%, al menos aproximadamente 95%, al menos aproximadamente 96%, al menos aproximadamente 97%, al menos aproximadamente 98%, al menos aproximadamente 99%, o 100% idéntica a una secuencia de aminoácidos que tiene SEQ ID NO: 106, en donde opcionalmente el FVIII comprende el dominio A1, dominio A2, dominio A3, dominio C1, dominio C2, y un dominio parcial o distinto de B, en donde opcionalmente el FVIII comprende una

secuencia de aminoácidos al menos aproximadamente 70%, al menos aproximadamente 75%, al menos aproximadamente 80%, al menos aproximadamente 85%, al menos aproximadamente 90%, al menos aproximadamente 95%, al menos aproximadamente 96%, al menos aproximadamente 97%, al menos aproximadamente 98%, al menos aproximadamente 99%, o 100% idéntica a la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:109, en donde opcionalmente:

el factor de coagulación comprende un radical heterólogo, en donde opcionalmente el radical heterólogo se selecciona del grupo que consiste en albúmina o un fragmento de la misma, una región Fc de inmunoglobulina, el péptido C-terminal (CTP) de la subunidad β de la gonadotropina corionica humana, una secuencia PAS, una secuencia HAP, una transferrina o un fragmento de la misma, un radical de unión a albúmina, un derivado del mismo, o cualquier combinación de los mismos, en donde opcionalmente el radical heterólogo está conectado al extremo N o al extremo C del FVIII o insertado entre dos aminoácidos en el FVIII, en donde opcionalmente el radical heterólogo se inserta entre dos aminoácidos en uno o más sitios de inserción seleccionados entre los sitios de inserción enumerados en la Tabla 4; el FVIII comprende además un dominio A1, dominio A2, dominio C1, dominio C2, un dominio B opcional, y un radical heterólogo, en donde el radical heterólogo se inserta inmediatamente aguas abajo del aminoácido 745 correspondiente a FVIII maduro (SEQ ID NO:106); el FVIII comprende además un compañero de unión a FcRn, en donde opcionalmente el compañero de unión a FcRn comprende una región Fc de un dominio constante de inmunoglobulina; la secuencia de ácido nucleico que codifica el FVIII tiene codones optimizados; y/o la secuencia de ácido nucleico que codifica el FVIII tiene codones optimizados para la expresión en un ser humano, en donde opcionalmente la secuencia de ácido nucleico que codifica el FVIII

comprende una secuencia de nucleótidos al menos aproximadamente 60%, al menos aproximadamente 65%, al menos aproximadamente 70%, al menos aproximadamente 75%, al menos aproximadamente 80%, al menos aproximadamente 85%, al menos aproximadamente 90%, al menos aproximadamente 95%, al menos aproximadamente 96%, al menos aproximadamente 97%, al menos aproximadamente 98%, al menos aproximadamente 99%, o aproximadamente 100% idéntica a una secuencia de nucleótidos de SEQ ID NO: 107, o la secuencia de ácido nucleico que codifica el FVIII comprende una secuencia de nucleótidos al menos aproximadamente 60%, al menos aproximadamente 65%, al menos aproximadamente 70%, al menos aproximadamente 75%, al menos aproximadamente 80%, al menos aproximadamente 85%, al menos aproximadamente 90%, al menos aproximadamente 95%, al menos aproximadamente 96%, al menos aproximadamente 97%, al menos aproximadamente 98%, al menos aproximadamente 99%, o aproximadamente 100% idéntica a la secuencia de nucleótidos de SEQ ID NO: 71.

8. La molécula de ácido nucleico de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, en donde opcionalmente:
la molécula de ácido nucleico se formula con un agente de suministro, en donde opcionalmente el agente de suministro comprende una nanopartícula lipídica, o el agente de suministro se selecciona del grupo que consiste en liposomas, moléculas poliméricas no lipídicas, y endosomas, y cualquier combinación de los mismos;
la molécula de ácido nucleico se formula para suministro intravenoso, transdérmico, intradérmico, subcutáneo, pulmonar, u oral, o cualquier combinación de los mismos, en donde opcionalmente la molécula de ácido nucleico se formula para suministro intravenoso.

9. Un vector que comprende la molécula de ácido nucleico de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7.
10. Una célula hospedadora que comprende la molécula de ácido nucleico de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7.
11. Una composición farmacéutica que comprende el ácido nucleico de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7 o el vector de la reivindicación 9, y un excipiente farmacéuticamente aceptable.
12. Una composición farmacéutica que comprende la célula anfitriona de la reivindicación 10 y un excipiente farmacéuticamente aceptable.
13. Un kit, que comprende la molécula de ácido nucleico de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7 e instrucciones para administrar la molécula de ácido nucleico a un sujeto que lo necesite.
14. Un sistema de baculovirus para la producción de la molécula de ácido nucleico de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, en donde opcionalmente la molécula de ácido nucleico se produce en células de insecto.
15. Un sistema de suministro de nanopartículas que comprende la molécula de ácido nucleico de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7.
16. Un método de producción de un polipéptido, que comprende cultivar la célula hospedadora de la reivindicación 10 en condiciones adecuadas y recuperar el polipéptido, en donde opcionalmente el polipéptido es un polipéptido con actividad de coagulación y el método comprende recuperar el polipéptido con actividad de coagulación.

17. Un método de expresión de una secuencia de polinucleótidos heteróloga en un sujeto que lo necesite, que comprende administrar al sujeto la molécula de ácido nucleico de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, el vector de la reivindicación 9, o la composición farmacéutica de la reivindicación 11.
18. Un método de expresión de un factor de coagulación en un sujeto que lo necesite, que comprende administrar al sujeto la molécula de ácido nucleico de la reivindicación 7, el vector de la reivindicación 9, el polipéptido de la reivindicación 16, o la composición farmacéutica de la reivindicación 11.
19. Un método de tratamiento de una enfermedad o trastorno en un sujeto que lo necesite, que comprende administrar al sujeto la molécula de ácido nucleico de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, el vector de la reivindicación 9, o la composición farmacéutica de la reivindicación 11.
20. Un método de tratamiento de una deficiencia de factor de coagulación en un sujeto que lo necesite, que comprende administrar al sujeto la molécula de ácido nucleico de la reivindicación 7, el vector de la reivindicación 9, el polipéptido de la reivindicación 16, o la composición farmacéutica de la reivindicación 11.
21. El método de la reivindicación 19 o 20, en donde opcionalmente:
la molécula de ácido nucleico se administra intravenosamente, transdérmicamente, intradérmicamente, subcutáneamente, oralmente, pulmonarmente, o cualquier combinación de las mismas, en donde opcionalmente la molécula de ácido nucleico se administra intravenosamente;
que comprende además administrar al sujeto un segundo agente;
en donde el sujeto es un mamífero;
en donde el sujeto es un ser humano;

en donde la administración de la molécula de ácido nucleico al sujeto da como resultado un aumento de la actividad de FVIII, con respecto a la actividad de FVIII en el sujeto antes de la administración, en donde la actividad de FVIII se incrementa en al menos aproximadamente 2 veces, al menos aproximadamente 3 veces, al menos aproximadamente 4 veces, al menos aproximadamente 5 veces, al menos aproximadamente 6 veces, al menos aproximadamente 7 veces, al menos aproximadamente 8 veces, al menos aproximadamente 9 veces, al menos aproximadamente 10 veces, al menos aproximadamente 11 veces, al menos aproximadamente 12 veces, al menos aproximadamente 13 veces, al menos aproximadamente 14 veces, al menos aproximadamente 15 veces, al menos aproximadamente 20 veces, al menos aproximadamente 25 veces, al menos aproximadamente 30 veces, al menos aproximadamente 35 veces, al menos aproximadamente 40 veces, al menos aproximadamente 50 veces, al menos aproximadamente 60 veces, al menos aproximadamente 70 veces, al menos aproximadamente 80 veces, al menos aproximadamente 90 veces, o al menos aproximadamente 100 veces; y/o

en donde el sujeto tiene un trastorno de sangrado, en donde opcionalmente el trastorno de sangrado es una hemofilia, en donde opcionalmente el trastorno de sangrado es hemofilia A.

22. Un método de tratamiento de un trastorno de sangrado en un sujeto que lo necesite, en donde opcionalmente el trastorno de sangrado es hemofilia A, que comprende administrar al sujeto una molécula de ácido nucleico que comprende una primera repetición terminal invertida (ITR) y una segunda ITR que flanquean un casete genético que comprende una secuencia de polinucleótidos heteróloga que codifica un factor de coagulación, en donde la primera ITR y/o la segunda ITR comprenden una secuencia de nucleótidos al menos aproximadamente 75%, al menos aproximadamente 80%, al menos aproximadamente 85%, al menos aproximadamente 90%, al menos aproximadamente 95%, al menos aproximadamente 96%, al menos

aproximadamente 97%, al menos aproximadamente 98%, al menos aproximadamente 99%, o 100% idéntica a una secuencia de nucleótidos expuesta en SEQ ID NO: 180, 181, 183, 184, 185, 186, 187 o 188, o un derivado funcional de la misma.

23. Un método de tratamiento de un trastorno metabólico del hígado en un sujeto que lo necesite, que comprende administrar al sujeto una molécula de ácido nucleico que comprende una primera repetición terminal invertida (ITR) y una segunda ITR que flanquean un casete genético que comprende una secuencia de polinucleótidos heteróloga que codifica una enzima metabólica asociada al hígado que es deficiente en el sujeto, en donde la primera ITR y/o la segunda ITR son una ITR de un virus no adenoasociado (no AAV).
24. El método de la reivindicación 23, opcionalmente:
 - en donde la primera ITR y/o la segunda ITR comprenden una secuencia de nucleótidos al menos aproximadamente 75%, al menos aproximadamente 80%, al menos aproximadamente 85%, al menos aproximadamente 90%, al menos aproximadamente 95%, al menos aproximadamente 96%, al menos aproximadamente 97%, al menos aproximadamente 98%, al menos aproximadamente 99%, o 100% idéntica a una secuencia de nucleótidos expuesta en SEQ ID NO: 180, 181, 183, 184, 185, 186, 187 o 188, o un derivado funcional de la misma;
 - en donde el casete genético comprende un ácido nucleico de hebra sencilla;
 - en donde el casete genético comprende un ácido nucleico de doble hebra;
 - en donde el trastorno metabólico del hígado se selecciona del grupo que consiste en fenilcetonuria (PKU), una enfermedad del ciclo de la urea, un trastorno de almacenamiento lisosómico, y una enfermedad de almacenamiento de glucógeno, en donde opcionalmente el trastorno metabólico del hígado es fenilcetonuria (PKU);
 - en donde la molécula de ácido nucleico se administra intravenosamente, transdérmicamente, intradérmicamente, subcutáneamente, oralmente,

pulmonarmente, o cualquier combinación de las mismas, en donde opcionalmente la molécula de ácido nucleico se administra intravenosamente;

que comprende además administrar al sujeto un segundo agente;

en donde el sujeto es un mamífero; y/o

en donde el sujeto es un ser humano.