

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 comprende una secuencia de polinucleótidos al menos aproximadamente un 75 % idéntica a la SEQ ID NO: 1, y la segunda ITR comprende una secuencia de polinucleótidos al menos aproximadamente un 75 % idéntica a la SEQ ID NO:

2.

2. La molécula de ácido nucleico de la reivindicación 1, en donde la primera ITR comprende una secuencia de polinucleótidos al menos aproximadamente un 80 %, al menos aproximadamente un 85 %, al menos aproximadamente un 90 %, al menos aproximadamente un 95 %, al menos aproximadamente un 96 %, al menos aproximadamente un 97 %, al menos aproximadamente un 98 %, al menos aproximadamente un 99 % idéntica a la SEQ ID NO:1.

3. La molécula de ácido nucleico de la reivindicación 1 o 2, en donde la primera ITR comprende la secuencia de polinucleótidos establecida en la SEQ ID NO: 1.

4. La molécula de ácido nucleico de una cualquiera de las reivindicaciones 1-3, en donde la segunda ITR comprende una secuencia de polinucleótidos al menos aproximadamente un

80 %, al menos aproximadamente un 85 %, al menos aproximadamente un 90 %, al menos aproximadamente un 95 %, al menos aproximadamente un 96 %, al menos aproximadamente un 97 %, al menos aproximadamente un 98 %, al menos aproximadamente un 99 % idéntica a la SEQ ID NO:2.

5. La molécula de ácido nucleico de cualquiera de las reivindicaciones 1-4, en donde la segunda ITR comprende la secuencia de polinucleótidos establecida en la SEQ ID NO: 2.

6. La molécula de ácido nucleico de la reivindicación 5, en donde la primera ITR comprende la secuencia de polinucleótidos establecida en la SEQ ID NO: 1 y la segunda ITR comprende la secuencia de polinucleótidos establecida en la SEQ ID NO: 2.

7. La molécula de ácido nucleico de una cualquiera de las reivindicaciones 1-6, que comprende además un promotor.

8. La molécula de ácido nucleico de la reivindicación 7, en donde el promotor es un promotor específico de tejido.

9. La molécula de ácido nucleico de la reivindicación 7 u 8, en donde el promotor dirige la expresión de la secuencia de polinucleótidos heteróloga en un órgano o tejido, en donde el órgano o tejido comprende músculo, sistema nervioso central (SNC), ojo, hígado, corazón, riñón, páncreas, pulmones, piel, vejiga, tracto urinario, bazo, linajes celulares mieloides y linfoides, o cualquier combinación de los mismos.

10. La molécula de ácido nucleico de una cualquiera de las reivindicaciones 7-9, en donde el promotor dirige la expresión de la secuencia de polinucleótidos heteróloga en hepatocitos, células epiteliales, células endoteliales, células musculares cardíacas, células musculares esqueléticas, células sinusoidales, neuronas aferentes, neuronas eferentes, interneuronas, células gliales, astrocitos, oligodendrocitos, microglía, células ependimarias, células epiteliales pulmonares, células de Schwann, células satélite, células fotorreceptoras, células ganglionares de la retina, células T, células B, células NK, macrófagos, células dendríticas, o cualquier combinación de las mismas.

11. La molécula de ácido nucleico de una cualquiera de las reivindicaciones 7-10, en donde el promotor está situado en 5' de la secuencia de polinucleótidos heteróloga.

12. La molécula de ácido nucleico de una cualquiera de las reivindicaciones 7-11, en donde el promotor es un promotor de la transtiretina de ratón (mTTR), un promotor del factor VIII humano nativo, un promotor de la antitripsina alfa-1 humana (hAAT), un promotor mínimo de la albúmina humana, un promotor de la albúmina de ratón, un promotor de la tristetraprolina (TTP), un promotor de CASI, un promotor de CAG, un promotor del citomegalovirus (CMV), un promotor de la antitripsina $\alpha 1$ (AAT), un promotor de la creatina quinasa muscular (MCK), un promotor de la cadena pesada de la miosina alfa (α MHC), un promotor de la mioglobina (MB), un promotor de la desmina (DES), un promotor SPc5-12,

un promotor 2R5Sc5-12, un promotor de dMCK, un promotor de tMCK, un promotor de la fosfoglicerato quinasa (PGK) o un promotor de A1AT.

13. La molécula de ácido nucleico de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 12, en donde la secuencia de polinucleótidos heteróloga comprende además una secuencia intrónica.

14. La molécula de ácido nucleico de la reivindicación 13, en donde la secuencia intrónica está situada en 5' de la secuencia de polinucleótidos heteróloga.

15. La molécula de ácido nucleico de la reivindicación 13 o 14, en donde la secuencia intrónica está situada en 3' del promotor.

16. La molécula de ácido nucleico de una cualquiera de las reivindicaciones 13-15, en donde la secuencia intrónica comprende una secuencia intrónica sintética.

17. La molécula de ácido nucleico de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 16, en donde el casete genético comprende además un elemento regulador postranscripcional.

18. La molécula de ácido nucleico de la reivindicación 17, en donde el elemento regulador postranscripcional está situado en 3' de la secuencia de polinucleótidos heteróloga.

19. La molécula de ácido nucleico de la reivindicación 17 o 18, en donde el elemento regulador postranscripcional comprende un elemento regulador del virus de la hepatitis de la marmota (WPRE), un sitio de unión de microARN, una secuencia de direccionamiento nuclear del ADN, una secuencia de inhibición de TLR9, o cualquier mutación de las mismas.

20. La molécula de ácido nucleico de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 19, en donde el casete genético comprende además una secuencia de cola de poli(A) 3'UTR.

21. La molécula de ácido nucleico de la reivindicación 20, en donde 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.

22. La molécula de ácido nucleico de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 21, en donde el casete genético comprende además una secuencia potenciadora.

23. La molécula de ácido nucleico de la reivindicación 22, en donde la secuencia potenciadora está situada entre la primera ITR y la segunda ITR.

24. La molécula de ácido nucleico de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 23, 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 postranscripcional y una secuencia de cola de poli(A) 3'UTR.

25. La molécula de ácido nucleico de la reivindicación 24, en donde 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 postranscripcional y una secuencia de cola de poli(A) 3'UTR.

26. La molécula de ácido nucleico de la reivindicación 25, en donde el casete genético comprende la secuencia de nucleótidos de la SEQ ID NO: 3.

27. La molécula de ácido nucleico de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 26, en donde el casete genético es un ácido nucleico monocatenario.

28. La molécula de ácido nucleico de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 26, en donde el casete genético es un ácido nucleico bicatenario.

29. La molécula de ácido nucleico de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 28, en donde la secuencia de polinucleótidos heteróloga codifica una proteína terapéutica.

30. La molécula de ácido nucleico de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 29, en donde la secuencia de polinucleótidos heteróloga codifica un factor de coagulación, un factor de crecimiento, una hormona, una citoquina, un anticuerpo, un fragmento del mismo, o cualquier combinación de los mismos.

31. La molécula de ácido nucleico de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 30, en donde la secuencia de polinucleótidos heteróloga codifica un factor de coagulación.

32. La molécula de ácido nucleico de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 30, en donde la secuencia de polinucleótidos heteróloga codifica un factor de crecimiento.

33. La molécula de ácido nucleico de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 30, en donde la secuencia de polinucleótidos heteróloga codifica una hormona.

34. La molécula de ácido nucleico de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 30, en donde la secuencia de polinucleótidos heteróloga codifica una citoquina.

35. La molécula de ácido nucleico de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 30, en donde la secuencia de polinucleótidos heteróloga codifica un anticuerpo o un fragmento del mismo.

36. La molécula de ácido nucleico de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 30, en donde la secuencia polinucleótida heteróloga codifica 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), GALT, OTC, CMD1A, LAMA2, o cualquier combinación de los mismos.

37. La molécula de ácido nucleico de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 28, en donde la secuencia de polinucleótidos heteróloga codifica un microARN (miARN).

38. La molécula de ácido nucleico de la reivindicación 37, en donde el miARN regula a la baja la expresión de un gen diana que comprende SOD1, HTT, RHO, CD38, o cualquier combinación de los mismos.

39. La molécula de ácido nucleico de la reivindicación 31, en donde el factor de coagulación comprende el factor I (FI), el factor II (FII), el factor III (FIII), el factor IV (FIV), el factor V (FV), el factor VI (FVI), el factor VII (FVII), el factor VIII (FVIII), el factor IX (FIX), el factor X (FX), el factor XI (FXI), el factor XII (FXII), el factor XIII (FXIII), el factor de Von Willebrand

(VWF), precalicreína, cininógeno de alto peso molecular, fibronectina, antitrombina III, cofactor II de la heparina, proteína C, proteína S, proteína Z, inhibidor de la proteasa relacionada con la proteína Z (ZPI), plasminógeno, alfa-2-antiplasmina, activador del plasminógeno tisular (tPA), uroquinasa, inhibidor del activador del plasminógeno 1 (PAI-1), inhibidor del activador del plasminógeno 2 (PAI-2), o cualquier combinación de los mismos.

40. La molécula de ácido nucleico de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 39, en donde la secuencia de polinucleótidos heteróloga está optimizada en codones.

41. La molécula de ácido nucleico de la reivindicación 40, en donde la secuencia de polinucleótidos heteróloga está optimizada en codones para su expresión en un ser humano.

42. La molécula de ácido nucleico de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 41, en donde la molécula de ácido nucleico está formulada con un agente de administración.

43. La molécula de ácido nucleico de la reivindicación 42, en donde el agente de administración comprende una nanopartícula lipídica (LNP).

44. La molécula de ácido nucleico de la reivindicación 42, en donde el agente de administración comprende liposomas, moléculas poliméricas no lipídicas, endosomas o cualquier combinación de los mismos.

45. La molécula de ácido nucleico de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 44, en donde la molécula de ácido nucleico está formulada para su administración intravenosa, transdérmica, intradérmica, intraneural, intraocular, intratecal, subcutánea, pulmonar u oral, o cualquier combinación de las mismas.

46. La molécula de ácido nucleico de la reivindicación 45, en donde la molécula de ácido nucleico está formulada para su administración intravenosa.

47. La molécula de ácido nucleico de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 44, en donde la molécula de ácido nucleico está formulada para su administración por inyección in situ.

48. La molécula de ácido nucleico de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 44, en donde la molécula de ácido nucleico está formulada para su administración por inhalación.

49. Un vector que comprende la molécula de ácido nucleico de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 41.

50. Una célula huésped que comprende la molécula de ácido nucleico de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 41 o el vector de la reivindicación 49.

51. La célula huésped de la reivindicación 50, en donde la célula huésped es una célula de insecto.

52. Una composición farmacéutica que comprende el ácido nucleico de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 41.

53. Una composición farmacéutica que comprende el vector de la reivindicación 49 y un excipiente farmacéuticamente aceptable.

54. Una composición farmacéutica que comprende la célula huésped de la reivindicación 50 y un excipiente farmacéuticamente aceptable.

55. Un kit que comprende la molécula de ácido nucleico de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 48 e instrucciones para administrar la molécula de ácido nucleico a un sujeto que la necesite.

56. Un sistema de baculovirus para la producción de la molécula de ácido nucleico de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 41.

57. El sistema de baculovirus de la reivindicación 56, en donde la molécula de ácido nucleico de una cualquiera de las reivindicaciones 1-41 se produce en células de insecto.

58. El sistema de baculovirus de la reivindicación 56 o 57, que comprende además un bácmido recombinante, en donde el bácmido recombinante comprende un gen VP80

variante, de manera que el báculo presenta una expresión reducida de su proteína codificada.

59. Un sistema de administración de nanopartículas que comprende la molécula de ácido nucleico de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 48.

60. Un método para expresar una secuencia de polinucleótidos heteróloga en un sujeto que la necesita, que comprende administrar al sujeto la molécula de ácido nucleico de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 48, el vector de la reivindicación 49, o la composición farmacéutica de una cualquiera de las reivindicaciones 52-54.

61. Un método para tratar una enfermedad o trastorno en un sujeto que lo necesita, que comprende administrar al sujeto la molécula de ácido nucleico de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 48, el vector de la reivindicación 49, o la composición farmacéutica de una cualquiera de las reivindicaciones 52-54.

62. Un método para tratar un trastorno hemorrágico que comprende:
administrar una molécula de ácido nucleico a un sujeto que la necesite,
en donde la molécula de ácido nucleico comprende la secuencia de nucleótidos de la SEQ ID NO: 3.

63. El método de la reivindicación 61 o 62, en donde el trastorno es la hemofilia A.

64. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 60-63, en donde la molécula de ácido nucleico se administra por vía intravenosa, transdérmica, intradérmica, intraneural, intraocular, intratecal, subcutánea, oral, pulmonar o cualquier combinación de las mismas.

65. El método de la reivindicación 64, en donde la molécula de ácido nucleico se administra por vía intravenosa.

66. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 60-63, en donde la molécula de ácido nucleico se administra por inyección in situ.

67. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 60-63, en donde la molécula de ácido nucleico se administra por inhalación.

68. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 60-66, en donde el sujeto es un mamífero.

69. El método de la reivindicación 67, en donde el mamífero es un ser humano.

70. Un bácmido recombinante que comprende:

una secuencia que codifica un Rep de HBoV1, en donde la secuencia de Rep de HBoV1 insertada interrumpe el marco de lectura de un gen informador o una parte funcional del mismo; y

una secuencia heteróloga que comprende una molécula de ácido nucleico que comprende la secuencia de nucleótidos de la SEQ ID NO: 3, 9, 14, 33 o 35.

71. Un conjunto de bácmidos recombinantes que comprende un primer bácmido y un segundo bácmido,

en donde el primer bácmido comprende una secuencia que codifica un Rep, en donde el Rep insertado interrumpe el marco de lectura de un gen informador o una parte funcional del mismo; y

en donde el segundo bácmido comprende una secuencia heteróloga que comprende una molécula de ácido nucleico que comprende la secuencia de nucleótidos de la SEQ ID NO: 3, 9, 14, 33 o 35.

72. Una línea celular estable que comprende la secuencia de ácido nucleico de la SEQ ID NO: 3, 9, 14, 33 o 35, en donde la secuencia de ácido nucleico está integrada de forma estable en el genoma de la línea celular estable.

73. Un método para generar una molécula de ADN con extremos cerrados (ADNce) que comprende infectar una célula de insecto con un baculovirus recombinante que comprende el bácmido de la reivindicación 69.

74. Un método para generar una molécula de ADN con extremos cerrados (ADNce) que comprende infectar una célula de insecto con un baculovirus recombinante que comprende el conjunto de bácmidos recombinantes de la reivindicación 70.

75. Un método para generar una molécula de ADN con extremos cerrados (ADNce) que comprende introducir un baculovirus que codifica una proteína Rep en la línea celular estable de la reivindicación 71.