



19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 358 292**

51 Int. Cl.:
A61K 48/00 (2006.01)
C12N 15/85 (2006.01)
C07H 21/04 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **00959442 .5**
96 Fecha de presentación : **25.08.2000**
97 Número de publicación de la solicitud: **1210123**
97 Fecha de publicación de la solicitud: **05.06.2002**

54 Título: **Vectores mutacionales de oligodesoxinucleótidos de cadena sencilla.**

30 Prioridad: **27.08.1999 US 384960**

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
09.05.2011

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
09.05.2011

73 Titular/es: **Cibus International L.P.**
Nemours Chambers
Road Town, Tortola, VG

72 Inventor/es: **Metz, Richard, A.;**
Walther, Debra, M. y
Frank, Bruce, L.

74 Agente: **García-Cabrerizo y del Santo, Pedro María**

ES 2 358 292 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín europeo de patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre concesión de Patentes Europeas).

DESCRIPCION

Vectores mutacionales de oligodesoxinucleótidos de cadena sencilla.

1. CAMPO DE LA INVENCION

5 La invención se refiere a oligodesoxinucleótidos de cadena sencilla, a algunos derivados de los mismos y a métodos de su uso para introducir un cambio predeterminado en una ubicación predeterminada en un gen diana en una célula viva. La célula puede ser una célula de mamífero, insecto, pez, gusano o ave, en un medio de cultivo artificial o en un organismo, una célula bacteriana o una célula vegetal. El gen diana puede ser un gen cromosómico o un gen extracromosómico, es decir en un cromosoma artificial bacteriano.

2. ANTECEDENTES DE LA INVENCION

10 Se han descrito técnicas de realización de un cambio predeterminado en una ubicación predeterminada en una secuencia de ácido nucleico diana de una célula. Estas técnicas utilizan las enzimas de la célula que conciernen a la reparación y a la recombinación homóloga del ADN. En estas técnicas se sintetiza un oligonucleótido o análogo de oligonucleótido que contiene dos regiones que tienen la secuencia del gen diana que flanquean a una región, denominada una "región mutadora", que difiere del gen diana. En esta solicitud dichos oligonucleótidos y análogos se denominarán de forma genérica "vectores mutacionales". Dichos vectores mutacionales pueden introducir cambios genéticos predeterminados en un gen diana mediante un mecanismo que se cree que implica recombinación homóloga y/o escisión y reparación de nucleótidos.

20 Las Patentes de Estados Unidos N° 5.565.350 y N° 5.731.181 de Kmiec describen vectores mutacionales que contienen cadenas complementarias en las que una primera cadena comprende análogos de ribonucleótidos que forman pares de bases de Watson-Crick con desoxirribonucleótidos de una segunda cadena. La Patente de Estados Unidos N° 6.004.804 de Kumar y Metz describe ciertas mejoras en vectores mutacionales de cadena doble, que incluyen una variante en la que la región mutadora está presente solamente en una de las dos cadenas. El uso de vectores mutacionales de tipo Kmiec en sistemas de mamíferos se describe en la Patente de Estados Unidos N° 5.760.012 y, junto con vehículos macromoleculares, en la Publicación de Patente Internacional WO 98/49350 de Kren et al., y en la Solicitud de Patente de Estados Unidos relacionada N° de Serie 09/108.006. Descripciones adicionales del uso de vectores mutacionales de tipo Kmiec pueden encontrarse en los documentos Cole-Strauss et al., 1996, Science 273: 1386; Kren et al., 1998, Nature Med. 4: 285; y Bandyopadhyay et al., 1999, J. Biol. Chem. 274: 10163.

25 El uso de vectores mutacionales de tipo Kmiec en células vegetales se describe en las Publicaciones de Patente Internacional WO 99/25853 de Pioneer Hi-Bred International, WO 99/07865 de Kimeragen, Inc. y WO 98/54330 de Zeneca Ltd. Las publicaciones científicas que describen el uso de vectores de tipo Kmiec en plantas incluyen los documentos Beetham et al., 1999, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 96: 8774 y Zhu, et al., 1999, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 96: 8768.

30 El uso de vectores mutacionales de tipo Kmiec y variantes de los mismos, que son de cadena doble, se describe en la Patente de Estados Unidos N° 6.004.804 de Kumar y Metz. La solicitud de Kumar y Metz enseña, entre otras cosas, que los vectores de tipo Kmiec y variantes de los mismos pueden usarse en células bacterianas.

35 El uso de oligodesoxinucleótidos de cadena sencilla como vectores mutacionales para realizar cambios en un gen cromosómico en la levadura, *S. cerevisiae*, se describió en informes del laboratorio del Dr. F. Sherman, Universidad de Yale. Moerschell et al., 1988, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 85: 524-528 y Yamamoto et al., 1992, Yeast 8: 935-948. La longitud óptima de los vectores mutacionales usados en estos estudios era de 50 nucleótidos.

40 Un informe aislado del uso de un polinucleótido de cadena sencilla y de cadena doble de 160 nucleótidos en un intento de realizar alteraciones en un gen cromosómico puede encontrarse en el documento Hunger-Bertling, 1990, Mol. Cell. Biochem. 92: 107-116. Los resultados para polinucleótidos de cadena sencilla fueron ambiguos debido a que solamente se analizó el producto de los experimentos que usaban polinucleótidos de cadena doble.

45 El uso de un fragmento de ADN de cadena sencilla de 488 pares de bases para realizar cambios específicos en el gen regulador de la conductancia transmembrana de la fibrosis quística ha sido descrito por Goncz et al., 1998, Hum. Mol. Genetics 7: 1913; y Kunzelmann et al., 1996, Gene Ther. 3: 859.

50 Se usaron oligodesoxinucleótidos de cadena sencilla de aproximadamente 40 nucleótidos de longitud en células de mamífero como control para estudios de genes episomales en los que el oligodesoxinucleótido se unió covalentemente a un oligonucleótido que forma una triple cadena y que el oligodesoxinucleótido en solitario dio como resultado tasas de cambio genético predeterminado del gen episomal de aproximadamente 1 por 5×10^4 , o menos. Chan et al., 1999, J. Biol. Chem. 74: 11541. Un informe anterior del uso de un oligodesoxinucleótido de cadena sencilla para realizar cambios predeterminados en un gen episomal en una célula de mamífero se encuentra en el documento Campbell et al., 1989, The New Biologist 1: 223.

55 Un aspecto de la descripción se refiere a oligodesoxinucleótidos que han sido modificados mediante la unión de un colorante de indocarbocianina. Se sabe que los colorantes de indocarbocianina son excelentes fluoróforos. La síntesis de indocarbocianina P cianoetil N,N diisopropil fosforamiditas bloqueadas que son adecuadas para su uso en síntesis de nucleótidos en fase sólida se describe en las Patentes de Estados Unidos N° 5.556.959 y N° 5.808.044.

60 Un segundo aspecto de la descripción se refiere a una composición que comprende un oligonucleótido de cadena sencilla que codifica un cambio genético predeterminado y a un vehículo macromolecular que comprende un ligando para un receptor en la superficie de la célula diana. Una composición que comprende una poli-L-lisina, un ligando para el receptor de asialoglicoproteínas y un oligodesoxinucleótido antisentido de entre 21 y 24 nucleótidos se describe en la Publicación de Patente Internacional WO 93/04701.

Un tercer aspecto de la descripción se refiere a una modificación de un oligodesoxinucleótido mediante la unión de un nucleótido unido en 3'-3'. La Patente de Estados Unidos N° 5.750.669 enseña dicho oligodesoxinucleótido modificado.

5 La citación o identificación de cualquier referencia en la Sección 2, o en cualquier sección de esta solicitud no debe interpretarse como una admisión de que dicha referencia está disponible como técnica anterior a la presente invención.

3. SUMARIO DE LA INVENCION

10 La presente invención se basa en el inesperado descubrimiento de que los oligodesoxinucleótidos de cadena sencilla, particularmente cuando se modifican apropiadamente o se colocan en una composición con un vehículo molecular adecuado, pueden ser tanto o más eficaces en la realización de cambios genéticos predeterminados a genes diana en células que la técnica anterior, es decir vectores mutacionales de tipo Kmiec. Un oligodesoxinucleótido de cadena sencilla adecuado para su uso de acuerdo con la presente invención se denomina en lo sucesivo en este documento un Vector Mutacional de Oligodesoxinucleótido de Cadena Sencilla o un SSOMV.

15 En una realización, la descripción proporciona una composición para su uso para realizar cambios en los genes cromosómicos de células animales, por ejemplo células de mamífero, constituida por el oligodesoxinucleótido que codifica el cambio genético y un vehículo macromolecular. El vehículo puede ser un polímero, una vesícula lipídica con núcleo acuoso o una nanoesfera lipídica. En una realización adicional que es adecuada para uso *in vivo*, el vehículo comprende además un ligando que se une a un receptor de la superficie celular que es internalizado, tal como un ligando para un receptor en un pozo recubierto de clatrina, por ejemplo, el receptor de asialoglicoproteínas, el receptor de ácido fólico o el receptor de transferrina. En realizaciones preferidas, el oligodesoxinucleótido se modifica mediante la unión de sustituyentes de bloqueo en 3' y 5' tales como un nucleótido citosina unido en 3'-3' y un colorante de indocarbocianina unido en 5'. En una realización alternativa, la modificación puede consistir en la sustitución del enlace fosfodiéster internucleotídico más en 3' y/o más en 5' por un enlace no hidrolizable, tal como un enlace fosforotioatodíéster o un enlace fosforamidato.

25 En una segunda realización, la descripción proporciona la modificación de los nucleótidos del extremo 3' y 5' del oligodesoxinucleótido que codifica el cambio genético predeterminado. La invención se basa además en el inesperado descubrimiento de que algunas de dichas modificaciones no bloquean la eficacia del oligodesoxinucleótido para producir cambios genéticos. Una de dichas realizaciones es la combinación de un nucleótido citosina unido en 3'-3' y un colorante de indocarbocianina unido en 5'. Modificados de este modo, los oligodesoxinucleótidos son más de 50 veces más eficaces que un oligodesoxinucleótido no modificado correspondiente, cuando se usan para realizar cambios genéticos en células bacterianas.

30 En una tercera realización, la invención proporciona métodos para la introducción de un cambio genético predeterminado en una célula vegetal mediante la introducción de un oligodesoxinucleótido que codifica el cambio genético predeterminado en el núcleo de una célula vegetal.

35 En realizaciones preferidas, el oligodesoxinucleótido es modificado mediante la unión de sustituyentes de bloqueo en 3' y 5', tal como un nucleótido citosina unido en 3'-3' y un colorante de indocarbocianina unido en 5'. En una realización alternativa, la modificación puede consistir en la sustitución del enlace fosfodiéster internucleotídico más en 3' y más en 5' por un enlace no hidrolizable tal como un enlace fosforotioatodíéster o un enlace fosforamidato. Como alternativa, en una tercera realización más pueden usarse un colorante de indocarbocianina unido en 5' y un enlace fosfodiéster internucleotídico más en 3' y un enlace no hidrolizable.

La presente invención puede entenderse más completamente en referencia a la siguiente descripción detallada y a ejemplos ilustrativos de realizaciones específicas.

4. DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCION

45 La secuencia del SSOMV se basa en los mismos principios que los vectores mutacionales de la técnica anterior. La secuencia del SSOMV contiene dos regiones que son homólogas con la secuencia diana separadas por una región que contiene la alteración genética deseada, denominada la "región mutadora". La región mutadora puede tener una secuencia que tiene la misma longitud que la secuencia que separa las regiones homólogas en la secuencia diana, pero que tiene una secuencia diferente. Dicha región mutadora provoca una sustitución. Como alternativa, las regiones homólogas en el SSOMV pueden ser contiguas entre sí, mientras que las regiones en el gen diana que tienen la misma secuencia están separadas por uno, dos o más nucleótidos. Dicho SSOMV causa una delección en el gen diana de los nucleótidos que están ausentes del SSOMV. Además, la secuencia del gen diana que es idéntica a las regiones homólogas puede ser adyacente en el gen diana pero estar separada por uno, dos o más nucleótidos en la secuencia del SSOMV. Dicho SSOMV causa una inserción en la secuencia del gen diana.

55 Los nucleótidos del SSOMV son desoxirribonucleótidos que están unidos mediante enlaces fosfodiéster no modificados excepto en que el enlace internucleotídico 3' terminal y/o 5' terminal o, como alternativa, los dos enlaces internucleotídicos 3' terminal y/o 5' terminal pueden ser un fosforotioato o un fosforamidato. Como se usa en este documento, un enlace internucleotídico es un enlace entre nucleótidos del SSOMV y no incluye el enlace entre el nucleótido del extremo 3' o el nucleótido del extremo 5' y un sustituyente de bloqueo, véase a continuación.

60 La longitud del SSOMV depende del tipo de célula en la que está ubicado el gen diana. Cuando el gen diana es un gen cromosómico de una célula animal, por ejemplo, una célula de mamífero o de ave, el SSOMV tiene entre 25 y 65 nucleótidos, preferentemente entre 31 y 59 desoxinucleótidos y de la forma más preferente entre 34 y 48 desoxinucleótidos. La longitud total de las regiones homólogas es habitualmente la longitud del SSOMV menos uno, dos o tres nucleótidos. Un nucleótido mutador puede introducirse en más de una posición en el SSOMV, lo que da como resultado más de dos regiones homólogas en el SSOMV. Haya dos o más regiones homólogas, las longitudes de al

menos dos de las regiones homólogas deben ser cada una de al menos 8 desoxinucleótidos.

5 Para las células procariotas, la longitud del SSOMV está entre 15 y 41 desoxinucleótidos. La longitud preferida del oligodesoxinucleótido para uso en procariotas depende del tipo de grupo protector en 3' que se usa. Cuando el sustituyente protector en 3' es una desoxicitidina unida en 3'-3', el oligonucleótido está preferentemente entre aproximadamente 21 y 28 desoxinucleótidos, en caso contrario la longitud óptima está entre 25 y 35 desoxinucleótidos. Las longitudes de las regiones de homología son, por consiguiente, una longitud total de al menos 14 desoxinucleótidos y al menos dos regiones de homología deben tener, cada una, longitudes de al menos 7 desoxinucleótidos.

10 Para las células vegetales, la longitud del SSOMV está entre 21 y 55 desoxinucleótidos y las longitudes de las regiones de homología son, por consiguiente, una longitud total de al menos 20 desoxinucleótidos y al menos dos regiones de homología deben tener, cada una, longitudes de al menos 8 desoxinucleótidos.

Dentro de estos intervalos, la longitud óptima del oligodesoxinucleótido se determina mediante el contenido de GC, cuanto mayor sea el contenido de GC, más corto será el oligodesoxinucleótido óptimo. Sin embargo, se prefiere un contenido de GC mayor del 50%.

15 El SSOMV puede usarse con cualquier tipo de célula animal, por ejemplo, una célula de mamífero, una célula de ave, una célula de insecto, una célula de pez, o una célula de gusano (nematodo). El SSOMV también puede usarse en cualquier tipo de célula vegetal. Adicionalmente, el SSOMV puede usarse con cualquier tipo de célula bacteriana, por ejemplo, células bacterianas Gram positivas o células bacterianas Gram negativas. Los tipos ejemplares de bacterias incluyen, *Salmonella*, *E. coli*, *Pseudomonas*, *Rostani*, etc. No es importante si las células se están replicando directamente o si el gen diana es transcripcionalmente activo. Sin embargo, cuando el gen diana está ubicado en una bacteria, es importante que la bacteria sea RecA⁺. Por lo tanto, la mayoría de las cepas de bacterias usadas habitualmente en trabajos con ADN recombinante no son adecuadas para su uso en la presente invención, dado que dichas bacterias son RecA⁻ para reducir la inestabilidad genética de los plásmidos clonados con ellas. Además, en las células bacterianas el gen diana puede estar ubicado en un plásmido o en un cromosoma artificial bacteriano (BAC), así como en el cromosoma bacteriano.

25 El SSOMV puede diseñarse para ser complementario con la cadena codificante o no codificante del gen diana. Cuando la mutación deseada es una sustitución de una única base, se prefiere que el nucleótido mutador sea uno de pirimidina. En la medida en que es coherente con la consecución del resultado funcional deseado, se prefiere que tanto el nucleótido mutador como el nucleótido fijado como diana en la cadena complementaria sean de pirimidinas. Se prefieren particularmente los SSOMV que codifican mutaciones de transversión, es decir, un nucleótido mutador C o T se empareja erróneamente, respectivamente, con un nucleótido C o T en la cadena complementaria.

30 Además del oligodesoxinucleótido, el SSOMV puede contener un sustituyente de bloqueo en 5' que está unido a los carbonos 5' terminales mediante un enlazador. La química del enlazador no es crítica exceptuando su longitud, que debe ser preferentemente de al menos 6 átomos de largo y que el enlazador debe ser flexible.

35 La química del sustituyente de bloqueo en 5' para células de mamífero, de ave o vegetales no es crítica exceptuando el peso molecular que debe ser menor de aproximadamente 1000 daltons. Puede usarse una variedad de sustituyentes no tóxicos tales como biotina, colesterol u otros esteroides o un colorante fluorescente catiónico no intercalante. Para su uso en sistemas bacterianos, sin embargo, el sustituyente de bloqueo tiene un efecto principal sobre la eficacia del SSOMV y es preferentemente una indocarbocianina 3,3,3',3'-tetrametil N,N'-oxialquilo sustituida. Se prefieren particularmente como reactivos para preparar SSOMV los reactivos comercializados como Cy3TM y Cy5TM por Amersham Pharmacia Biotech, Piscataway, NJ, que son fosforamiditas bloqueadas que, después de la incorporación en un oligonucleótido, producen colorantes de indomonocarbocianina e indodicarbocianina 3,3,3',3'-tetrametil N,N'-isopropilo sustituidas, respectivamente. Cuando la indocarbocianina está N-oxialquilo sustituida, puede unirse convenientemente al extremo 5' del oligodesoxinucleótido mediante un fosfodiéster con un fosfato 5' terminal. La química del enlazador del colorante entre el colorante y el oligodesoxinucleótido no es crítica y se selecciona por conveniencia de la síntesis. Cuando se usa la fosforamidita Cy3 disponible en el mercado como se ha indicado, la modificación en 5' resultante está constituida por un sustituyente de bloqueo y un enlazador juntos que son una N-hidroxipropil, N'-fosdatidilpropil 3,3,3',3'-tetrametil indomonocarbocianina.

En una realización alternativa, el colorante de indocarbocianina, por ejemplo, fosforamidato Cy3, puede unirse al oligodesoxinucleótido después de que el oligodesoxinucleótido se haya sintetizado.

50 En la realización preferida, el colorante de indocarbocianina está tetra sustituido en las posiciones 3 y 3' de los anillos de indol. Sin limitarse a ninguna teoría, estas sustituciones impiden que el colorante sea un colorante intercalante. La identidad de los sustituyentes en estas posiciones no es crítica.

55 El SSOMV puede tener además un sustituyente de bloqueo en 3'. De nuevo, la química del sustituyente de bloqueo en 3' no es crítica, exceptuando la no toxicidad y un peso molecular menor de aproximadamente 1000, cuando el gen diana está ubicado en una célula diferente de una célula bacteriana. Sin embargo, cuando el gen diana está ubicado en una célula bacteriana, el sustituyente de bloqueo en 3' preferido es un llamado nucleótido invertido, es decir, un nucleótido que está unido mediante un fosfodiéster 3'-3' no sustituido, como enseña la Patente de Estados Unidos N° 5.750.669. En una realización más preferida, el nucleótido invertido es una timidina o, de la forma más preferida, una desoxicitidina. Para su uso en células bacterianas, la combinación de un sustituyente de bloqueo en 5' Cy3 y un sustituyente de bloqueo en 3' desoxicitidina invertida se prefiere particularmente, ya que las dos modificaciones tienen un efecto sinérgico sobre la eficacia del SSOMV. El SSOMV con las modificaciones mencionadas anteriormente puede sintetizarse mediante síntesis de nucleótidos en fase sólida convencional.

65 El SSOMV puede introducirse en la célula que contiene el gen diana mediante las mismas técnicas que se usan para introducir los vectores mutacionales de tipo Kmiec en células animales y vegetales. Para las células bacterianas, un método preferido de introducción del SSOMV es mediante electroporación.

Para su uso con células animales, incluyendo células de mamífero y de ave, el método preferido de administración a las células es mediante el uso de un vehículo macromolecular protector. Los reactivos de transfección con liposomas disponibles en el mercado tales como Lipofectamine™ y Superfect™ están diseñados de modo que el ácido nucleico que se va a transfectar sea electrolíticamente adherente a la superficie expuesta del liposoma. Dichos vehículos no se prefieren tanto como los vehículos macromoleculares protectores. Los vehículos macromoleculares protectores adecuados se describen en la Publicación de Patente Internacional WO 98/49350 y WO 99/40789 y en el documento Bandyopadhyay et al., 1999, J. Biol. Chem. 274: 10163.

Un vehículo macromolecular particularmente preferido es una vesícula lipídica con núcleo acuoso o liposoma en la que el SSOMV está atrapado en el núcleo acuoso. Dichas vesículas se preparan tomando una película lipídica sin disolvente y añadiendo una solución acuosa del SSOMV, seguido de agitación en vórtice, extrusión o el paso a través de una membrana de microfiltración. En una realización preferida, los constituyentes lipídicos son una mezcla de dioleoil fosfatidilcolina/dioleoil fosfatidilserina/galactocerebrósido en una proporción de 1:1:0,16. Otros vehículos incluyen policationes, tales como una polietilenimina, que tiene un peso molecular de entre 500 daltons y 1,3 Md, siendo 25 kd una especie adecuada y nanoesferas lipídicas, en los que el SSOMV se proporciona en forma de una sal lipolítica.

Cuando los SSOMV se usan para introducir cambios genéticos en células de mamífero y de ave, se prefiere que el vehículo macromolecular comprenda además un ligando para un receptor de la superficie celular que sea internalizado. Los receptores adecuados son los receptores que se internalizan mediante la ruta de pozos recubiertos de clatrina, tales como el receptor de asialoglucoproteínas, el receptor del factor de crecimiento epidérmico y el receptor de transferrina. También son adecuados receptores que se internalizan a través de la ruta caveolar tales como el receptor de ácido fólico. El galactocerebrósido es un ligando para el receptor de asialoglucoproteínas. Como se usa en este documento, un receptor internalizable es un receptor que se internaliza mediante la ruta de pozos recubiertos con clatrina o mediante la ruta caveolar.

El SSOMV puede usarse para cualquier propósito para el que se emplearon vectores mutacionales de la técnica anterior. Los usos específicos incluyen la cura de enfermedades genéticas invirtiendo la lesión genética causante de la enfermedad; dichas enfermedades incluyen, por ejemplo hemofilia, deficiencia de α_1 antitripsina y síndrome de Crigler-Najjar y las otras enfermedades las enseña la Publicación de Patente Internacional WO 98/49350.

Como alternativa, el SSOMV puede usarse para modificar plantas con los fines descritos en la publicación de patente WO 99/07865.

Un uso adicional de SSOMV en las plantas es la generación de plantas resistentes a herbicidas mediante medios que evitan tener que introducir un gen extraño o heterólogo en una planta de cultivo. Es de particular interés la resistencia al herbicida glifosato (ROUNDUP®). La identidad de las mutaciones que otorgan resistencia a glifosato puede encontrarse en las Publicaciones de Patente Internacional WO 99/25853 y WO 97/04103.

Como alternativa, el SSOMV puede usarse para modificar bacterias. El uso de SSOMV para la manipulación genética de las bacterias es particularmente valioso en los campos de la producción de antibióticos y en la construcción de bacterias atenuadas específicamente para la producción de vacunas. En ambas aplicaciones anteriores, es importante que los genes de resistencia a antibióticos no permanezcan en las bacterias modificadas finales.

Más aún, el SSOMV puede usarse junto con un cromosoma artificial bacteriano (BAC) para modificar un gen fijado como diana de cualquier especie que se haya clonado en un BAC. Puede incorporarse un fragmento mucho mayor que el gen fijado como diana. El BAC que tiene el gen fijado como diana clonado se coloca en un huésped bacteriano y se introduce un cambio genético predeterminado de acuerdo con la invención. Un subclon de BAC que tiene el cambio genético predeterminado puede identificarse y el inserto retirarse para un uso adicional. La presente invención permite que los cambios predeterminados se realicen sin el tiempo y los gastos esperados para obtener la preparación de fragmentos de PCR y la inserción de los fragmentos de vuelta al gen original.

5. EJEMPLO 1: TRATAMIENTO DE LA RATA GUNN

La rata Gunn contiene una mutación en el gen de UDP-glucuronosiltransferasa, que es el mismo gen que muta en el síndrome de Crigler-Najjar. Roy-Chowdhury et al., 1991, J. Biol. Chem. 266: 18294; Iyanangi et al., 1989, J. Biol. Chem. 264: 21302. En la rata Gunn hay una mutación en el nucleótido 1206 que ha delecionado una G. Un SSOMV de 35 nucleótidos, denominado CN3-35UP, correspondiente a la cadena antisentido, se construyó para invertir la mutación y tiene la siguiente secuencia: 5'-ATCATCGGCAGTCATTT C CAGGACATTCAGGGTCA-3' (SEC ID N° 1). CN3-35LOW, un segundo SSOMV que corresponde a la cadena sentido tiene la siguiente secuencia: 5'-TGACCCTGAATGTCCTG G AAATGACTGCCGATGAT-3' (SEC ID N° 2). El núcleo mutador está en negrita.

CN3-35UP modificado con Cy3 en 5' (5' Cy3) y con desoxicitidina en 3'-3' (3'-3' dC) (2 animales) y CN3-35LOW y CN3-35UP no modificados se formularon en una vesícula lipídica con núcleo acuoso que tiene constituyentes lipídicos de dioleoil fosfatidilcolina/dioleoil fosfatidilserina/galactocerebrósido en una proporción de 1:1:0,16. Aproximadamente 2,0 ml de dextrosa al 5% que contenía 500 μ g del SSOMV se usaron para hidratar 2 mg de lípido, las vesículas se extrudieron a continuación a un diámetro de 0,5 μ m. la eficacia de encapsulación era del 80%. Un grupo de control positivo se trató con vectores mutacionales de tipo Kmiec (2 animales) proporcionados en una cantidad equimolar en el mismo vehículo. Ratas, que pesaban 250 gramos, se trataron durante cinco días consecutivos con 300 μ g de SSOMV o el vehículo. Los niveles de bilirrubina en suero resultantes eran los siguientes en mg/dl.

R/días después de R	0 d	14 d	21 d	26 d	39 d
UP no modificado	6,3	4,6	5,4	4,2	3,2
UP modificado	7,9, 6,5	4,1, 3,3	4,9, 5,0	4,2, 3,8	3,6, 3,0
LOW modificado	6,8	4,3	5,9	4,2	3,5
Tipo Kmiec	6,3, 7,1	4,6, 5,7	4,8, 4,2	5,5, 5,1	4,4, 4,7

5 Los datos demuestran que tanto los SSOMV modificados como los no modificados y tanto las secuencias sentido como antisentido eran al menos equivalentes y en los puntos temporales más largos los SSOMV parecían superiores a los vectores mutacionales de tipo Kmiec.

6. EJEMPLO 2: MODIFICACIÓN DEL GEN DE UDP-GLUCURONOSILTRANSFERASA HUMANA

10 El siguiente ejemplo muestra que un SSOMV no modificado en un vehículo macromolecular puede usarse para introducir un cambio genético específico en una célula de mamífero en un medio artificial con tasas que están dentro de un factor de 3 del observado con los vectores mutacionales ADN/2'OMeARN de tipo Kmiec. Los datos muestran además que modificaciones tan mínimas como un único enlace fosforotioato pueden dar como resultado tasas completamente comparables.

15 Un grupo de individuos de etnia Amish tienen el síndrome de Crigler-Najjar resultante de una sustitución de C→A en el nucleótido 222 del gen de UDP-Glucuronosiltransferasa. La mutación da como resultado la conversión de un codón TAC (Tyr) en un codón de terminación TAA. Se diseñó un SSOMV diseñado para introducir la mutación causante de la enfermedad en una línea celular de carcinoma hepatocelular humano, HuH-7. Un SSOMV de 35 nucleótidos, denominado CNAM3-35UP, corresponde a la cadena antisentido y tiene la siguiente secuencia: 5'-GGGTACGTCTTCAAGGT T TAAAATGCTCCGTCTCT-3' (SEC ID N° 3). El nucleótido mutador está en negrita.

20 A células HuH-7 a $10^6/cm^2$ se les proporcionaron 300 μ l preparados en un vehículo de acuerdo con el método del Ejemplo 1 que contenían CNAM3-35UP, CNAM3-35UP, modificados de forma diversa o una cantidad equimolar de un vector mutacional de tipo Kmiec de 82 nucleótidos. Las células se recogieron y el fragmento génico relevante se amplificó mediante PCR, se clonó y se analizó mediante hibridación específica de alelo de acuerdo con el método de Bandyopadhyay, *supra*. Se observaron las siguientes tasas de conversión:

SSOMV no modificado	6%
SSOMV con 5' Cy3	15%
SSOMV con 3'-3' dC	5%
SSOMV con 5' Cy3, 3'-3' dC	15%
SSOMV con 5' fosforotioato	16%
3' fosforotioato	12%
Vector mutacional de tipo Kmiec	14%

25 Estos datos demuestran que, en presencia de un vehículo macromolecular, los SSOMV modificados eran tan eficaces como los vectores mutacionales de tipo Kmiec, y que los SSOMV no modificados eran tan eficaces dentro de un factor de 3.

7. EJEMPLO 3: CONVERSIÓN DE RESISTENCIA A KANAMICINA EN UN BAC

30 El siguiente ejemplo muestra que los SSOMV modificados son más eficaces que los vectores mutacionales ADN/2'OMeARN de tipo Kmiec en células bacterianas.

Un gen de resistencia a kanamicina se inactivó mediante la inserción de un codón de terminación ATG "en marco". La resistencia a kanamicina se recupera convirtiendo el tercer nucleótido en una C, es decir, realizando una transversión en el tercer nucleótido.

35 La secuencia de un SSOMV de 41 nucleótidos que corresponde a la cadena sentido para la recuperación de la resistencia a Kanamicina es la siguiente: 5'-GTGGAGAGGCTATTCGGCTA C GACTGGGCACAACAGACAAT-3' (SEC ID N° 4). El nucleótido mutador está en negrita.

Para generar pBACKans, se insertó un enlazador BamHI en el único sitio SmaI de pKans, y el fragmento BamHI-HindIII de 1,3 kb resultante que contiene el gen de kanamicina mutante se insertó en los sitios BamHI/HindIII del vector de clonación del BAC pBeloBACII (Genome Systems, Inc., St. Louis, MO). Las cepas de *Escherichia coli* MC1061

y DH10B se transformaron con pBACKans, se seleccionaron en placas de agar LB con cloranfenicol, y se hicieron electrocompetentes.

5 Cuarenta μ l de células electrocompetentes se electroporaron con entre 5 y 10 μ g de SSOMV usando las siguientes condiciones: 25 kV/cm, 200 ohmios, 25 microfaradios. Se añadió 1 ml de SOC a las células inmediatamente después de la electroporación y el cultivo se cultivó durante 1 hora con agitación a 37°C. Se añadieron 4 ml de LB + cloranfenicol (12,5 μ g/ml final) y los cultivos se cultivaron durante 2 horas adicionales con agitación a 37°C. Se sembraron diluciones apropiadas del cultivo en placas de LB-cloranfenicol para evaluar la viabilidad y en placas de LB-kanamicina para evaluar la conversión. La frecuencia de conversión se calculó dividiendo el número de colonias resistentes a kanamicina/ml por el número de colonias resistentes a cloranfenicol/ml.

10 La tasa de conversión observada con el SSOMV de 25 nucleótidos modificado en 5' Cy3, 3'-3' dC corresponde a aproximadamente 1 conversión por 100 bacterias supervivientes.

Las tasas de conversión relativas fueron:

Vector mutacional Kmiec de 68 nt con enlazador de 2'OMe ARN	0,04
Vector mutacional Kmiec de 68 nt con enlazador de ADN	0,004
SSOMV de 41 nt con 3',5' fosforotioato	0,4
SSOMV de 35 nt con 3',5' fosforotioato	4,0
SSOMV de 29 nt con 3',5' fosforotioato	0,9
SSOMV de 25 nt con 3',5' fosforotioato	1,0
SSOMV de 41 nt con 3'-3' dC, 5' Cy3	2,0
SSOMV de 35 nt con 3'-3' dC, 5' Cy3	2,9
SSOMV de 35 nt con 3'-3' dC	2,5
SSOMV de 35 nt con 5' Cy3	2,5
SSOMV de 29 nt con 3'-3' dC, 5' Cy3	4,2
SSOMV de 25 nt con 3'-3' dC, 5' Cy3	42,0
SSOMV de 25 nt con 3'-3' dC	1,3
SSOMV de 25 nt con 5' Cy3	1,8
SSOMV de 25 nt con 3' fosforotioato, 5' Cy3	8,4
SSOMV de 35 nt con 3' fosforotioato, 5' Cy3	10,2

15 Estos datos demuestran que la tasa de conversión del SSOMV óptimo era entre 10^3 y 10^4 veces mayor que la del vector mutacional de tipo Kmiec.

8. EJEMPLO 4: EL USO DE UN SSOMV SIN UN VEHÍCULO PROTECTOR EN UNA CÉLULA DE MAMÍFERO - RESISTENCIA A HIGROMICINA

20 Este ejemplo muestra la modificación de una célula de mamífero usando SSOMV modificados en ausencia de un vehículo macromolecular protector. Los SSOMV modificados fueron capaces de introducir la modificación genética con una tasa que era entre 15 y 30 veces mayor que los vectores mutacionales de tipo Kmiec. Este ejemplo usa el mismo gen que en el Ejemplo 3; sin embargo, éste se expresa en la línea celular HuH-7.

25 Un clon de células HuH7 que contenía una copia integrada de forma estable del gen de kanamicina mutante en un vector que contiene IRES (pIRESKan-) se generaron con selección en higromicina. Las células se cultivaron en DMEM rico en glucosa/FBS al 10% que contiene 100 mg/ml de higromicina para mantener una expresión alta a partir de la construcción integrada. Veinticuatro horas antes de la transfección, las células se sembraron con una densidad de $1,0 \times 10^6$ células en una placa de 100 mm. Dos horas antes de la transfección, el medio de cultivo se sustituyó por 10 ml de OptiMEM™. Cuarenta microgramos de oligonucleótido y 40 ml (80 μ g) de Lipofectamine™ se diluyeron en tubos diferentes que contenían 200 ml de Opti-MEM, pH 8,5. A continuación se añade Lipofectamine al oligonucleótido, se mezcla con una pipeta y se incubaba a temperatura ambiente durante 30 minutos antes de la adición de 3,6 ml de Opti-MEM a pH 8,5. El medio se aspira de las células y se sustituye por la mezcla de transfección de 4 ml. Las células se incuban durante 2 horas a 37°C antes de que la mezcla de transfección se sustituya por medios de cultivo convencionales. Dos días después de la transfección, las células se dividen en 2 placas de 100 mm en 10 ml de medio que contiene 450 mg/ml de G418. El medio que contiene G418 se sustituye diariamente durante 10 días, y después dos veces a la semana hasta que las colonias son visibles al microscopio (16-18 días después de la transfección). Los clones se toman aproximadamente 21 días después de la transfección y se expanden para realizar el análisis molecular.

Las tasas de fondo del desarrollo de resistencia a higromicina son de aproximadamente 1 por 10^6 cuando se emplearon vectores mutacionales de tipo Kmiec, y no había aumentado del número de colonias resistentes. El análisis de secuencia de una de las 5 colonias mostraba que ésta había obtenido la mutación específica. Las mutaciones en las otras 4 colonias no pudieron identificarse. Cuando se usó un SSOMV de 41 nucleótidos con 3'-3' dC, 5' Cy3, las tasas de desarrollo de colonias resistentes a higromicina aumentaban entre 15 y 30 veces, es decir, hasta aproximadamente 3 por 10^5 . El análisis de secuencia de estas colonias mostraba que entre el 100% y el 80% de las colonias tenían el cambio genético correcto. Los experimentos con SSOMV de 35 nucleótidos con 3'-3' dC, 5' Cy3 o con 3' fosforotioato 5' Cy3 o con dos enlaces fosforotioato en cada uno de los extremos 3', 5', mostraban cada uno tasas de desarrollo de resistencia a higromicina que eran aproximadamente la mitad de las del SSOMV de 41 nucleótidos modificado.

10. EJEMPLO 5: EL USO DE UN SSOMV SIN UN VEHÍCULO PROTECTOR EN UNA CÉLULA DE MAMÍFERO - TIROSINASA

Este ejemplo muestra que, en una línea celular de mamífero, un SSOMV no modificado sin un vehículo protector puede ser superior tanto al SSOMV modificado con 5' Cy3/3'-3' dC como a los vectores mutacionales ADN/2'OMe ARN de tipo Kmiec.

Estos experimentos usan Melan-c, una línea celular de melanocito murina que tiene una mutación C→G en el codón 82 del gen de tirosina, que crea una terminación "en marco". Bennett, et al., 1989, Development 105: 379. Se diseñó un SSOMV de 35 nucleótidos que corresponde a la secuencia codificante y tiene la siguiente secuencia: 5' CCCCAAATCCAACTTA C AGTTTCCGCAGTTGAAA-3' (SEC ID N° 5). El nucleótido mutador está en negrita.

Se cultivaron células Melan-c en medio RPMI que contenía suero fetal bovino al 10%, forbol 12-miristato 13-acetato (PMA) 100 nM y b-mercaptoetanol 0,1 mM (Gibco, Bethesda, MD). Dos días antes de la transfección, las células se sembraron a una densidad de $0,5-1,5 \times 10^5$ células/pocillo en una placa de 6 pocillos y se alimentaron de nuevo con medio fresco 24 horas antes de la transfección. De cinco a diez microgramos (220-440 nM) de los oligonucleótidos, se incubaron con 6-9 μg de Superfectin™ en 0,1 ml de TE (TRIS 10 mM, pH 7,5, EDTA 1 mM) durante 30 minutos a temperatura ambiente. La mezcla de transfección se añadió a las células que contenían 0,9 ml de medio de cultivo DMEM rico en glucosa que contenía suero al 10% y PMA 100 nM. Después de 6-18 horas, las células se lavaron con solución salina tamponada con fosfato y se alimentaron con 2 ml del medio DMEM. Las células se supervisaron en busca de un cambio en la pigmentación mediante microscopía. El número de sucesos de conversión se determinó contando el número de células o agrupaciones de células pigmentadas de 5 a 8 días después de la transfección.

Las tasas de conversión de albino→tipo silvestre (pigmentado) por 10^5 células fueron las siguientes:

Vector mutacional de tipo Kmiec	1
SSOMV no modificado	5
SSOMV con 3', 5' fosforotioato	6
SSOMV con 3'-3' dC	2
SSOMV con 5' Cy3	3
SSOMV con 3'-3' dC, 5' Cy3	1

10. EJEMPLO 6: EL USO DE UN SSOMV MODIFICADO EN PLANTAS

Este ejemplo se refiere al uso de un SSOMV para introducir una mutación Ser→Asn en la posición 653 de la acetohidroxiácido sintasa de *Arabidopsis thaliana* (también conocida como acetolactato sintasa). La mutación requiere que un codón AGT se convierta en un codón AAT e introduce resistencia a herbicidas de imidazolina así como a herbicidas de sulfonil urea.

Se sintetizaron un SSOMV de 25 nucleótidos y un SSOMV de 35 nucleótidos que tenían modificaciones 3'-3' dC y 5' Cy3 y tenían las siguientes secuencias, respectivamente: 5' CGATCCCGA A TGGTGGCACTTT-3' (SEC ID N° 6), 5'-GTTGCCGATCCCGA A TGGTGGCACTTTCAACG-3' (SEC ID N° 7). El nucleótido mutador está en negrita.

Se preparó una población desagregada de células de *A. thaliana*, se sembró a 10^6 por placa y se sometió a introducción biobalística del SSOMV o un vector mutacional de tipo Kmiec que tenía la misma secuencia. Las placas de control usando un plásmido determinaron que la eficacia del sistema biobalístico es de aproximadamente una administración por 200 células sembradas. Después de dos meses de selección con Imazaquin™ 10 μM , cada una de las poblaciones tratadas mediante biobalística mostraban una tasa de fondo corregida de resistencia a Imazaquin de aproximadamente 1 por 10^3 células en las que los vectores mutacionales se habían introducido con éxito.

11. EJEMPLO 7: PREPARACIÓN DE PEI CONJUGADA CON FOLATO

Este ejemplo describe la preparación de PEI conjugada con folato que es adecuada para su uso como vehículo macromolecular en la invención.

El ácido fólico (4,4 mg, 10 μmoles) en tampón de fosfato sódico (1,5 ml, 133 mM, pH 4,5) se trató con 200 μl de piridina y clorhidrato de 1-(3-dimetilaminopropil)-3-etilcarbodiimida (EDC, 15,5 mg, 98 μmoles) y se incubó a temperatura ambiente durante 1 hora. La solución de fosfato activada (1,7 ml) se añadió a una solución acuosa de polietilenimina (25

kDa, 24,55 mg/ml; 1,02 ml) y se incubó durante 3 días a temperatura ambiente con agitación suave. La polietilenimina conjugada se purificó mediante diálisis contra agua a través de una membrana de límite de peso molecular 12 kDa. El producto era positivo para aminas mediante el ensayo de ninhidrina y folato mediante absorbancia UV con máximos a 259, 289 y 368 nm.

5 El acoplamiento era de aproximadamente 1-2 restos de folato por 1000 aminas, que es equivalente a 1-2 folatos por molécula de PEI.

10 La presente invención no tiene su alcance limitado por las realizaciones específicas descritas en este documento. De hecho, diversas modificaciones de la invención, además de las descritas en este documento, se volverán evidentes para los expertos en la materia a partir de la descripción anterior y las figuras adjuntas. Dichas modificaciones pretenden estar dentro del alcance de las reivindicaciones adjuntas.

LISTA DE SECUENCIAS

- 15 <110> Valigen (US), Inc.
- <120> Vectores mutacionales de oligodesoxinucleótidos de cadena sencilla
- <130> SMW/FP5992748
- 20 <140> EP 00959442.5
- <141> 25-08-2000
- <150> PCT/US00/23457
- <151> 25-08-2000
- 25 <150> US 09/384.960
- <151> 27-08-1999
- <160> 7
- 30 <170> FastSEQ para Windows Versión 3.0
- <210> 1
- <211> 35
- 35 <212> ADN
- <213> Secuencia artificial
- <220>
- <223> vector mutacional de oligodesoxinucleótido de cadena sencilla
- 40 <400> 1 atcatcgga gtcattcca ggacattcag ggtca 35
- <210> 2
- <211> 35
- 45 <212> ADN
- <213> Secuencia artificial
- <220>
- <223> vector mutacional de oligodesoxinucleótido de cadena sencilla
- 50 <400> 2 tgaccctgaa tgtcctgaa atgactgccg atgat 35

<210> 3
 <211> 35
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 5
 <220>
 <223> vector mutacional de oligodesoxinucleótido de cadena sencilla

 <400> 3 gggtagctct tcaaggttta aaatgctccg tctct 35
 10
 <210> 4
 <211> 41
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 15
 <220>
 <223> vector mutacional de oligodesoxinucleótido de cadena sencilla

 <400> 4 gtggagaggc tattcggcta cgactgggca caacagaca t 41
 20
 <210> 5
 <211> 35
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 25
 <220>
 <223> vector mutacional de oligodesoxinucleótido de cadena sencilla

 <400> 5 ccccaaatcc aaacttacag ttccgcagt tgaat 35
 30
 <210> 6
 <211> 22
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 35
 <220>
 <223> vector mutacional de oligodesoxinucleótido de cadena sencilla

 <400> 6 cgatcccgaat tggggcact tt 22
 40
 <210> 7
 <211> 32
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 45
 <220>
 <223> vector mutacional de oligodesoxinucleótido de cadena sencilla

 <400> 7 gttgccgatc ccgaatggtg gcacttcaa cg 32
 50

REIVINDICACIONES

1. Un método de obtención de una célula animal que contiene un cambio genético predeterminado en un gen cromosómico fijado como diana que comprende:
- a) proporcionar una población de células animales en un medio de cultivo;
 - 5 b) añadir una composición al medio de cultivo, composición que comprende:
 - 10 1) un oligodesoxinucleótido de cadena sencilla que tiene un nucleótido del extremo 3', un nucleótido del extremo 5', que tiene al menos 25 desoxinucleótidos y no más de 65 desoxinucleótidos y que tiene una secuencia que comprende al menos dos regiones, cada una de al menos 8 desoxinucleótidos que son cada una, respectivamente, idénticas a al menos dos regiones del gen cromosómico fijado como diana, regiones que juntas tienen al menos 24 nucleótidos de longitud, y son complementarias a la cadena codificante o a la no codificante del gen cromosómico fijado como diana y regiones que están separadas por al menos un nucleótido en la secuencia del gen cromosómico fijado como diana o en la secuencia del oligodesoxinucleótido o en ambas, codificando dicho al menos un nucleótido el cambio genético predeterminado; y
 - 15 2) un vehículo macromolecular seleccionado entre el grupo constituido por
 - i) una vesícula lipídica con núcleo acuoso, en la que el núcleo acuoso contiene el oligodesoxinucleótido de cadena sencilla,
 - ii) una nanoesfera lipídica, que comprende una sal lipofílica del oligodesoxinucleótido de cadena sencilla, y
 - 20 iii) un polícatión que tiene un peso molecular medio de entre 500 daltons y 1,3 Md en el que el polícatión forma una sal con el oligodesoxinucleótido de cadena sencilla; y
 - c) identificar una célula de la población que tiene el cambio genético predeterminado.
2. El método de la reivindicación 1, que comprende además aislar a la célula identificada.
3. El método de la reivindicación 1, en el que la longitud del oligodesoxinucleótido de cadena sencilla es de al menos 31 desoxinucleótidos y no superior a 59 desoxinucleótidos.
4. El método de la reivindicación 1, en el que el vehículo macromolecular comprende además un ligando para un receptor internalizable de la célula, ligando que está fijado a la superficie del vehículo macromolecular.
5. El método de la reivindicación 4, en el que el receptor se selecciona entre el grupo constituido por el receptor de asialoglicoproteínas, el receptor de transferrina y el receptor del factor de crecimiento epidérmico.
6. El método de la reivindicación 4, en el que el receptor es el receptor de ácido fólico.
7. El método de la reivindicación 1, en el que el enlace internucleotídico unido al nucleótido del extremo 3' es un enlace fosforotioato.
8. El método de la reivindicación 1, en el que el enlace internucleotídico unido al nucleótido del extremo 5' es un enlace fosforotioato.
9. El método de la reivindicación 1, en el que el hidroxilo 5' del nucleótido del extremo 5' está unido a un sustituyente de bloqueo en 5'.
10. El método de la reivindicación 9, en el que el sustituyente de bloqueo en 5' es un colorante de indocarbocianina N1-hidroxiálquilo sustituido y 3,3,3',3'-tetra sustituido, que está unido al hidroxilo 5' mediante un enlazador.
11. El método de la reivindicación 10, en el que el colorante de indocarbocianina y el enlazador juntos son una N-hidroxipropil, N¹-fosfatidilpropil 3,3,3',3'-tetrametil indomonocarbocianina.
12. El método de la reivindicación 10, en el que el enlace internucleotídico unido al nucleótido del extremo 3' es un enlace fosforotioato.
13. El método de la reivindicación 1, en el que el hidroxilo 3' del nucleótido del extremo 3' está unido a un sustituyente de bloqueo en 3'.
14. El método de la reivindicación 13, en el que el sustituyente de bloqueo en 3' es un nucleótido de bloqueo que está unido en 3'-3' al hidroxilo 3' del nucleótido del extremo 3'.
15. Un método de obtención de una célula animal que contiene un cambio genético predeterminado en un gen cromosómico fijado como diana, que comprende:
- a) proporcionar una población de células animales en un medio de cultivo;
 - 50 b) añadir un compuesto al medio de cultivo; en el que dicho compuesto comprende: un oligodesoxinucleótido de cadena sencilla que tiene un nucleótido del extremo 3', un nucleótido del extremo 5', que tiene al menos 25 desoxinucleótidos y no más de 65 desoxinucleótidos y que tiene una secuencia que comprende al menos dos

- regiones, cada una de al menos 8 desoxinucleótidos que son cada una, respectivamente, idénticas a al menos dos regiones del gen cromosómico fijado como diana, regiones que juntas tienen al menos 24 nucleótidos de longitud, y son complementarias a la cadena codificante o a la no codificante del gen cromosómico fijado como diana y regiones que están separadas por al menos un nucleótido en la secuencia del gen cromosómico fijado como diana o en la secuencia del oligodesoxinucleótido o en ambas, codificando dicho al menos un nucleótido el cambio genético predeterminado; y
- 5 c) identificar una célula de la población que tiene el cambio genético predeterminado.
16. El método de la reivindicación 15, en el que el enlace internucleotídico unido al nucleótido del extremo 3' es un enlace fosforotioato.
- 10 17. El método de la reivindicación 16, en el que el enlace internucleotídico unido al nucleótido del extremo 5' es un enlace fosforotioato.
18. Un método de obtención de una célula animal que contiene un cambio genético predeterminado en un gen cromosómico fijado como diana, que comprende:
- a) proporcionar una población de células animales en un medio de cultivo;
- 15 b) añadir una composición al medio de cultivo; en el que dicha composición comprende: un oligodesoxinucleótido de cadena sencilla que tiene un nucleótido del extremo 3', un nucleótido del extremo 5', que tiene al menos 25 desoxinucleótidos y no más de 65 desoxinucleótidos y que tiene una secuencia que comprende al menos dos regiones, cada una de al menos 8 desoxinucleótidos que son cada una, respectivamente, idénticas a al menos dos regiones del gen cromosómico fijado como diana, regiones que juntas tienen al menos 24 nucleótidos de longitud, y son complementarias a la cadena codificante o a la no codificante del gen cromosómico fijado como diana o en la secuencia del oligodesoxinucleótido o en ambas, codificando dicho al menos un nucleótido el cambio genético predeterminado; y en el que el enlace internucleotídico unido al nucleótido del extremo 3' y al nucleótido del extremo 5' son enlaces fosforotioato, y
- 20 c) identificar una célula de la población que tiene el cambio genético predeterminado.
19. El método de la reivindicación 16, en el que un colorante de indocarbocianina N¹-hidroxialquilo sustituido y 3,3,3',3'-tetra sustituido está unido al hidroxilo 5' del nucleótido del extremo 5' mediante un enlazador.
20. El método de la reivindicación 15, en el que el enlace internucleotídico unido al nucleótido del extremo 5' es un enlace fosforotioato.
- 30 21. El método de la reivindicación 20, en el que el enlace internucleotídico unido al nucleótido del extremo 3' es un enlace fosforotioato o en el que un nucleótido de desoxicitina o de timidina está unido en 3'-3' al hidroxilo 3' del nucleótido del extremo 3' o ambos.
22. Un método de obtención de una célula vegetal que contiene un cambio genético predeterminado en un gen cromosómico fijado como diana, que comprende:
- 35 a) introducir un compuesto en una población de células vegetales; en el que dicho compuesto comprende un oligodesoxinucleótido de cadena sencilla que tiene un nucleótido del extremo 3', un nucleótido del extremo 5', que tiene al menos 21 desoxinucleótidos y no más de 55 desoxinucleótidos y que tiene una secuencia que comprende al menos dos regiones, cada una de al menos 8 desoxinucleótidos que son cada una, respectivamente, idénticas a al menos dos regiones del gen fijado como diana, regiones que juntas tienen al menos 20 nucleótidos de longitud, y son complementarias a la cadena codificante o a la no codificante del gen cromosómico fijado como diana y regiones que están separadas por al menos un nucleótido en la secuencia del gen fijado como diana o en la secuencia del oligodesoxinucleótido de cadena sencilla o en ambas, codificando dicho al menos un nucleótido el cambio genético predeterminado; y
- 40 b) identificar una célula de la población que tiene el cambio genético predeterminado.
- 45 23. El método de la reivindicación 22, que comprende además aislar a la célula identificada.
24. El método de la reivindicación 22, en el que el hidroxilo 5' del nucleótido del extremo 5' está unido a un sustituyente de bloqueo en 5'.
25. El método de la reivindicación 24, en el que el hidroxilo 3' del nucleótido del extremo 3' está unido a un sustituyente de bloqueo en 3'.
- 50 26. El método de la reivindicación 25, en el que
- a) el sustituyente de bloqueo en 5' es un colorante de indocarbocianina N¹-hidroxialquilo sustituido y 3,3,3',3'-tetra sustituido, que está unido mediante un enlazador al hidroxilo 5' del nucleótido del extremo 5'; y
- b) el sustituyente de bloqueo en 3' es un nucleótido de bloqueo que está unido en 3'-3' al hidroxilo 3' del nucleótido del extremo 3'.
- 55 27. El método de la reivindicación 26, en el que el oligodesoxinucleótido de cadena sencilla tiene al menos 25 desoxinucleótidos y no más de 35 desoxinucleótidos de longitud.

28. El método de la reivindicación 26, en el que el nucleótido de bloqueo es uno de desoxicitina o de timidina.
29. El método de la reivindicación 26, en el que el colorante de indocarbocianina y el enlazador juntos son una N-hidroxiopropil, N¹-fosfatidilpropil 3,3,3',3'-tetrametil indomonocarbocianina.
- 5 30. El método de la reivindicación 22, en el que el enlace internucleotídico unido al nucleótido del extremo 3' es un enlace fosforotioato.
31. El método de la reivindicación 22, en el que el enlace internucleotídico unido al nucleótido del extremo 5' es un enlace fosforotioato.
32. El método de la reivindicación 22, en el que
- a) el hidroxilo 5' del nucleótido del extremo 5' está unido a un sustituyente de bloqueo en 5'; y
- 10 b) el enlace internucleotídico unido al nucleótido del extremo 3' es un enlace fosforotioato.
33. El método de la reivindicación 32, en el que el sustituyente de bloqueo en 5' es un colorante de indocarbocianina N¹-hidroxialquilo sustituido y 3,3,3',3'-tetra sustituido, que está unido mediante un enlazador al hidroxilo 5' del nucleótido del extremo 5'.
- 15 34. El método de la reivindicación 1, en el que la célula animal se selecciona entre el grupo constituido por una célula de mamífero, una célula de ave, una célula de insecto, una célula de gusano y una célula de pez.
35. El método de la reivindicación 17 ó 20, en el que la célula animal se selecciona entre el grupo constituido por una célula de mamífero, una célula de ave, una célula de insecto, una célula de gusano y una célula de pez.
36. Un método de obtención de una célula bacteriana que contiene un cambio genético predeterminado en un gen diana, que comprende:
- 20 a) introducir un compuesto en una población de células bacterianas;
- en el que dicho compuesto comprende un oligodesoxinucleótido de cadena sencilla que tiene un nucleótido del extremo 3', un nucleótido del extremo 5', que tiene al menos 15 desoxinucleótidos y no más de 35 desoxinucleótidos y que tiene una secuencia que comprende al menos dos regiones, cada una de al menos 7 desoxinucleótidos que son cada una, respectivamente, idénticas a al menos dos regiones del gen fijado como diana, regiones que juntas tienen al menos 14 nucleótidos de longitud, y son complementarias a la cadena codificante o a la no codificante del gen fijado como diana y regiones que están separadas por al menos un nucleótido en la secuencia del gen fijado como diana o en la secuencia del oligodesoxinucleótido de cadena sencilla o en ambas, codificando dicho al menos un nucleótido el cambio genético predeterminado; en el que el oligodesoxinucleótido tiene una modificación seleccionada entre el grupo constituido por:
- 25 1) el hidroxilo 5' del nucleótido del extremo 5' está unido a un sustituyente de bloqueo en 5',
- 2) el hidroxilo 3' del nucleótido del extremo 3' está unido a un sustituyente de bloqueo en 3',
- 3) el enlace internucleotídico unido al nucleótido del extremo 5' se sustituye por un enlace no hidrolizable, o
- 30 4) el enlace internucleotídico unido al nucleótido del extremo 3' se sustituye por un enlace no hidrolizable; y
- 35 b) identificar una célula de la población que tiene el cambio genético predeterminado.
37. El método de la reivindicación 36, que comprende además aislar a la célula identificada.
38. El método de la reivindicación 36, en el que el gen fijado como diana está en un cromosoma artificial bacteriano.
- 40 39. El método de la reivindicación 36, en el que el enlace internucleotídico unido al nucleótido del extremo 5' es un enlace fosforotioato, o en el que un colorante de indocarbocianina N¹-hidroxialquilo sustituido y 3,3,3',3'-tetra sustituido, está unido mediante un enlazador al hidroxilo 5' del nucleótido del extremo 5'.
40. El método de la reivindicación 36 ó 39, en el que el enlace internucleotídico unido al nucleótido del extremo 3' es un enlace fosforotioato, o en el que un nucleótido de desoxicitina o de timidina está unido en 3'-3' al hidroxilo 3' del nucleótido del extremo 3'.
- 45 41. El método de la reivindicación 36, en el que el sustituyente de bloqueo en 5' es N-hidroxiopropil, N¹-fosfatidilpropil 3,3,3',3'-tetrametil indomonocarbocianina.
42. El método de la reivindicación 36, en el que el sustituyente de bloqueo en 3' es una desoxicitina unida en 3'-3'.
- 50 43. El método de la reivindicación 36, en el que el enlace internucleotídico no hidrolizable unido al nucleótido del extremo 5' es un enlace fosforotioato.
44. El método de la reivindicación 36, en el que el enlace internucleotídico no hidrolizable unido al nucleótido del

extremo 5' es un enlace fosforamidato.

45. El método de la reivindicación 36, en el que el enlace internucleotídico no hidrolizable unido al nucleótido del extremo 3' es un enlace fosforotioato.

5 46. El método de la reivindicación 36, en el que el enlace internucleotídico no hidrolizable unido al nucleótido del extremo 3' es un enlace fosforamidato.