(19) OFICINA ESPAÑOLA DE PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

(11) Número de publicación: **2 407 679**

(51) Int. Cl.:

C12N 15/10 (2006.01)
C12Q 1/68 (2006.01)

(12) TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA T3

(96) Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **21.12.2006** **E 06835675 (7)**

(97) Fecha y número de publicación de la concesión europea: **13.03.2013** **EP 2002001**

(54) Título: **Intercambio de nucleótidos seleccionados mejorado con oligonucleótidos modificados con ANB**

(30) Prioridad:

22.12.2005 WO PCT/NL2005/000884
09.05.2006 WO PCT/NL2006/000244

(45) Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
13.06.2013

(73) Titular/es:

KEYGENE N.V. (100.0%)
AGRO BUSINESS PARK 90
6708 PW WAGENINGEN, NL

(72) Inventor/es:

BUNDOCK, PAUL;
DE BOTH, MICHIEL, THEODOOR, JAN;
HOGERS, RENÉ, CORNELIS, JOSEPHUS y
WACHOWSKI, LUDVIK, KEVIN

(74) Agente/Representante:

TORNER LASALLE, Elisabet

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).

ES 2 407 679 T3

DESCRIPCIÓN

Intercambio de nucleótidos seleccionados mejorado con oligonucleótidos modificados con ANB.

Campo de la invención

La presente invención versa acerca de un procedimiento para la alteración específica y selectiva de una secuencia de nucleótidos en un sitio específico del ADN en una célula diana mediante la introducción de un oligonucleótido en esa célula. El resultado es el intercambio seleccionado de uno o más nucleótidos para que la secuencia del ADN diana se convierta en la del oligonucleótido cuando sean diferentes. Más en particular, la invención versa acerca del intercambio de nucleótidos seleccionados usando oligonucleótidos modificados. La invención también versa acerca de la aplicación del procedimiento.

Antecedentes de la invención

La modificación genética es el procedimiento de creación deliberada de cambios en el material genético de células vivas con el propósito de modificar o una más propiedades biológicas codificadas genéticamente de esa célula, o del organismo del cual forma parte la célula o en el cual puede regenerarse. Estos cambios pueden adoptar la forma de una deleción de partes del material genético, una adición de material genético exógeno o cambios en la secuencia de nucleótidos existente del material genético. Se conocen procedimientos para la modificación genética de organismos eucariotas hace más de 20 años y han encontrado una aplicación generalizada en células vegetales, humanas y animales y en microorganismos para mejoras en los campos de la agricultura, la salud humana, la calidad de los alimentos y la protección medioambiental. Los procedimientos comunes de modificación genética consisten en añadir fragmentos de ADN exógeno al genoma de una célula, que entonces conferirá una nueva propiedad a esa célula o a su organismo sobre y por encima de las propiedades codificadas por genes ya existentes (incluyendo aplicaciones en las que la expresión de los genes existentes será suprimida por ello). Aunque muchos de tales ejemplos son efectivos en la obtención de las propiedades deseadas, estos procedimientos, no obstante, no son muy precisos, porque no hay ningún control sobre las posiciones genómicas en las que se insertan los fragmentos de ADN exógeno (y, por ende, sobre los niveles definitivos de expresión), y porque el efecto deseado tendrá que manifestarse sobre las propiedades naturales codificadas por el genoma original y bien equilibrado. Por el contrario, procedimientos de modificación genética que den como resultado la adición, la deleción o la conversión de nucleótidos en *loci* genómicos predefinidos permitirán la modificación precisa de genes existentes.

El intercambio de nucleótidos seleccionados dirigido por oligonucleótidos (TNE, a veces ODTNE) es un procedimiento que se basa en el suministro al núcleo de la célula eucariota de oligonucleótidos sintéticos (moléculas consistentes en tramos cortos de restos de tipo nucleótido que se asemejan al ADN en sus propiedades de apareamiento de bases de Watson-Crick, pero que pueden ser químicamente diferentes del ADN) (Alexeev y Yoon, Nature Biotechnol. 16: 1343, 1998; Rice, Nature Biotechnol. 19: 321, 2001; Kmiec, J. Clin. Invest. 112: 632, 2003). Diseñando deliberadamente un nucleótido discrepante en la secuencia de homología del oligonucleótido, el nucleótido discrepante puede ser incorporado en la secuencia genómica de ADN. Este procedimiento permite la conversión de nucleótidos aislados o, como mucho, de algunos nucleótidos en *loci* existentes, pero puede ser aplicado para crear codones finalizadores en genes existentes, dando como resultado una alteración de su función, o crear cambios en los codones, dando como resultado genes que codifican proteínas con una composición alterada de aminoácidos (ingeniería de proteínas).

El intercambio de nucleótidos seleccionados (TNE) ha sido descrito en células vegetales, animales y de levadura. Los primeros informes sobre TNE utilizaban lo que se denominaba quimera, que consistía en un oligonucleótido autocomplementario que está diseñado para intercalarse en el sitio de la diana cromosómica. La quimera contiene un nucleótido discrepante que forma la plantilla para introducir la mutación en la diana cromosómica. Para seleccionar eventos de TNE, la mayoría de los estudios intenten introducir un cambio de un solo nucleótido en un gen endógeno que conduce a la resistencia a herbicidas. Los primeros ejemplos que usaban quimeras procedían de células humanas (véase la reseña: Rice y otros, Nat. Biotech. 19: 321-326). El uso de quimeras también ha tenido éxito en las especies vegetales tabaco, arroz y maíz (Beetham y otros, 1999 Proc. Natl. Acad. Sci. USA 96: 8774-8778; Kocheverko y otros, 2003 Plant Phys. 132: 174-184; Okuzaki y otros, 2004 Plant Cell Rep. 22: 509-512). Sin embargo, se descubrió que la actividad de las quimeras era difícil de reproducir y, por ello, se ha sometido a ensayo la actividad del TNE de oligonucleótidos monocatenarios (mc). Se ha descubierto que estos dan resultados más reproducibles en células de trigo, de levadura y humanas (Liu y otros, 2002 Nuc. Acids Res. 30: 2742-2750; reseña, Parekh-Olmedo y otros, 2005 Gene Therapy 12: 639-646; Dong y otros, 2006 Plant Cell Rep. 25: 457-65).

Varios grupos han demostrado que también puede detectarse el TNE usando extractos de proteína total celular. Tales ensayos de búsqueda de actividad de TNE se denominan ensayos libres de células (Cole-Strauss y otros, 1999 Nucleic Acids Res. 27: 1323-1330; Gamper y otros, 2000 Nucleic Acids Res. 28, 4332-4339; Kmiec y otros, 2001 Plant J. 27: 267-274; Rice y otros, 2001 40: 857-868). El ensayo se configura como sigue. Se muta un plásmido que contiene dos genes bacterianos de resistencia a los antibióticos (kanamicina y carbenicilina) para que uno de los genes de resistencia a los antibióticos (por ejemplo, kanamicina) contenga un codón finalizador dentro del marco de lectura debido a la alteración de un solo nucleótido (por ejemplo, TAT a TAG). A continuación se incuba este plásmido mutado con proteína total celular y un oligonucleótido monocatenario diseñado para corregir el codón

finalizador en el gen de resistencia a los antibióticos. Las proteínas necesarias para el TNE están presentes en el extracto celular y utilizan el oligonucleótido para alterar el codón finalizador en el gen de resistencia a los antibióticos, restaurando el fenotipo de resistencia. A continuación se purifica el ADN plasmídico a partir de la mezcla de reacción y se transforma en E. coli. Acto seguido, las bacterias son cultivadas en placas sobre medios que contienen kanamicina, y el número de colonias bacterianas representa el número de eventos de reparación de TNE. Se calcula la eficacia de la electroporación contando el número de colonias que se desarrollan en medios que contienen carbenicilina. La eficacia del TNE puede ser cuantificada calculando la proporción de plásmidos reparados con respecto al número total de plásmidos transformados.

En un experimento de este tipo, el oligonucleótido efectúa una sustitución, alterando TAG a TAC. Además, el sistema libre de células también puede usarse para estudiar la posibilidad de usar oligonucleótidos para producir inserciones de nucleótidos individuales. Pueden producirse plásmidos que tengan delecionado un único nucleótido del gen de resistencia a los antibióticos, generando una mutación del marco de lectura. En el ensayo libre de células, se repara la deleción mediante la adición de un nucleótido mediado por el oligonucleótido.

El mayor problema afrontado por la aplicación del TNE en células de organismos superiores como las plantas es la poca eficacia que se ha documentado hasta ahora. En el maíz, Zhu y otros, (2000 Nature Biotech. 18: 555-558) documentaron una frecuencia de conversión de 1×10^{-4}. Estudios posteriores en el tabaco (Kochevenko y otros, 2003 Plant Phys. 132: 174-184) y el arroz (Okuzaki y otros, 2004 Plant Cell Rep. 22: 509-512) han documentado frecuencias de 1×10^{-6} y 1×10^{-4}, respectivamente. Estas frecuencias siguen siendo demasiado bajas para la aplicación práctica del TNE.

La replicación fiel de ADN es uno de los criterios clave que media el mantenimiento de la estabilidad genómica y garantiza que la información genética contenida en el ADN se transmite libre de mutación de una generación a la siguiente. Surgen muchos errores de la lesión a la cadena de ADN parental o son generados por agentes que reaccionan con bases de ADN (luz UV, toxinas medioambientales). Todo organismo debe mantener una salvaguardia para evitar o corregir estas mutaciones. Se cree que el sistema de reparación de discrepancias (MRM) reconoce y corrige bases discrepantes o no pareadas causadas durante la replicación del ADN en la vigilancia de lesiones del ADN y en la prevención de la recombinación entre secuencias no idénticas (Fedier y Fink, 2004 Int. J Oncol. 2004; 24 (4):1039-47), y contribuye a la fidelidad de la replicación del ADN en células vivas.

El TNE ha sido descrito en varias solicitudes de patente de Kmiec, *inter alia* en WO0173002, WO03/027265, WO01/87914, WO99/58702, WO97/48714, WO02/10364. En WO 01/73002 se contempla que la baja eficacia de la alteración de genes obtenida usando oligonucleótidos de ADN no modificados se cree de forma generalizada que es consecuencia de la degradación de los oligonucleótidos donadores por nucleasas presentes en la mezcla de reacción o la célula diana. Para remediar este problema, se propone incorporar nucleótidos modificados que vuelvan los oligonucleótidos resultantes resistentes a las nucleasas. Ejemplos típicos incluyen nucleótidos con enlaces de fosforotioato, análogos de 2'-O-metilo o ácidos nucleicos bloqueados (ANB). Estas modificaciones se sitúan preferentemente en los extremos del oligonucleótido, dejando un dominio central de ADN rodeando la base seleccionada. Además, la publicación estipula que hay implicadas interacciones químicas específicas entre el oligonucleótido conversor y las proteínas implicadas en la conversión. Es imposible predecir el efecto de tales interacciones químicas para producir *termini* resistentes a las nucleasas usando modificaciones distintas de la incorporación de ANB, enlaces de fosforotioato o análogos de 2'-O-metilo en el oligonucleótido, porque no se conocen aún las proteínas implicadas en el proceso de alteración ni su interacción química con los sustituyentes del oligonucleótido y, según los inventores de WO0173002, no pueden predecirse.

Dado que la eficacia de los procedimientos actuales de ODTNE es relativamente baja (según se ha afirmado anteriormente, entre 10^{-6} y 10^{-4}, pese a tasas elevadas documentadas de suministro del oligonucleótido del 90%), existe la necesidad en la técnica de dar con procedimientos para el TNE que sean más eficaces. En consecuencia, los presentes inventores se han propuesto mejorar la tecnología de TNE existente.

Descripción de la invención

En las reivindicaciones se da a conocer la presente invención. Los presentes inventores han descubierto ahora que incorporando nucleótidos al oligonucleótido donador para el TNE que sean capaces de enlazarse con más fuerza al ADN aceptor que los correspondientes nucleótidos no modificados como A, C, T o G, la tasa del TNE puede aumentar significativamente. Sin restringirse con consideraciones teóricas, los presentes inventores creen que mediante la incorporación de nucleótidos modificados en el oligonucleótido donador, el oligonucleótido donador se enlaza con más fuerza al ADN aceptor y, por ende, aumenta la proporción del TNE. Los presentes inventores han descubierto que los oligonucleótidos que contienen uno o más ANB en posiciones cercanas a la discrepancia, pero no (directamente) adyacentes a la misma, es decir, situados a una distancia de al menos un nucleótido con respecto a la discrepancia, mejoran significativamente la eficacia del TNE.

Con este fin, se ha investigado el efecto del uso de oligonucleótidos que incorporan uno o más ANB en diversas posiciones en el oligonucleótido sobre la frecuencia del TNE en el sistema libre de células. Se comparó la actividad del TNE de tales oligonucleótidos con la actividad del TNE de oligonucleótidos compuestos de ADN normal. Se encontró que los oligonucleótidos que contenían uno o más ANB en posiciones alejadas al menos un nucleótido con

respecto a la discrepancia aumentaban la eficacia del TNE tanto para sustituciones como para inserciones en el ensayo libre de células hasta un nivel no observado hasta el momento. Los oligonucleótidos que contenían ANB eran hasta 10 veces más eficaces en el ensayo libre de células en comparación con los oligonucleótidos compuestos de ADN normal. También se halló que la eficacia del TNE podía mejorar más aumentando el número de ANB en el oligonucleótido, por lo que los ANB se sitúan con una separación de al menos 2, preferentemente de al menos 3, más preferentemente de al menos 4 nucleótidos. Además, se encontró que la mejora observada era independiente del *lucus*, indicando que los oligonucleótidos de la invención con ANB en posiciones particulares con respecto a la discrepancia son capaces de proporcionar frecuencias mejoradas de TNE de una manera independiente de la especie, como en células vegetales y animales.

La presente invención se basa, así, en la consideración inventiva de que el intercambio de nucleótidos seleccionados deseado puede lograrse mediante el uso de oligonucleótidos parcialmente modificados (es decir, como máximo un 75%, preferentemente como máximo un 50%) con ANB. La ubicación, el tipo y la cantidad de modificación del oligonucleótido pueden variarse, dentro de límites, tal como se dará a conocer en lo que sigue en el presente documento.

Así, la presente divulgación, en un aspecto, proporciona oligonucleótidos modificados con ANB. Los oligonucleótidos mc modificados con ANB pueden ser usados para introducir cambios genéticos específicos en células vegetales, animales o humanas. La invención es aplicable en los campos de la investigación biomédica, la agricultura y para construir plantas y animales, incluyendo seres humanos, mutados específicamente. La invención también es aplicable en el campo de la medicina y de la terapia génica.

La secuencia de un oligonucleótido de la invención es homóloga a la cadena diana salvo la parte que contiene una base discrepante que introduce el cambio de base en la cadena diana. Se introduce la base discrepante en la secuencia diana. Manipulando la modificación (en comparación con A, C, T o G convencionales) de los nucleótidos y, más en particular, manipulando la ubicación y la cantidad de la modificación del oligonucleótido con ANB que introduce la discrepancia, puede mejorar la eficacia (o el grado de incorporación exitosa del nucleótido deseado en la posición deseada en el doblete de ADN).

Otro aspecto de la divulgación reside en un procedimiento para la alteración seleccionada de una cadena de ADN parental (primera cadena, segunda cadena) poniendo en contacto el doblete de ADN parental con un oligonucleótido que contenga al menos un nucleótido discrepante en comparación con la cadena parental, conteniendo el oligonucleótido donador una sección que está modificada con ANB en posiciones particulares para que tenga una mayor capacidad de enlace que la cadena parental (aceptora) en presencia de proteínas que sean capaces de intercambio de nucleótidos seleccionados.

Así, el quid de la invención se encuentra en la mejora en la capacidad de enlace del oligonucleótido intercalante (a veces denominado donador) con oligonucleótidos de ANB con respecto al oligonucleótido intercalante no modificado, situándose la modificación con ANB en una o más posiciones que no son adyacentes a la discrepancia.

Descripción detallada de la invención

En un aspecto, la divulgación se refiere a un oligonucleótido para la alteración seleccionada de una secuencia de ADN bicatenario que contiene una primera secuencia de ADN y una segunda secuencia de ADN que es el complemento de la primera secuencia de ADN, comprendiendo el oligonucleótido un dominio que es capaz de hibridarse en la primera secuencia de ADN, dominio que comprende al menos una discrepancia con respecto a la primera secuencia de ADN, y comprendiendo el oligonucleótido al menos una sección que contiene al menos un nucleótido modificado que tiene una mayor afinidad de enlace que los A, C, T o G presentes de manera natural, enlazándose el al menos un nucleótido modificado con más fuerza con un nucleótido en una posición opuesta en la primera secuencia de ADN, siendo el al menos un nucleótido modificado un ANB que está situado a una distancia de al menos un nucleótido con respecto a la al menos una discrepancia y, preferentemente, conteniendo el oligonucleótido, como máximo, aproximadamente un 75% de nucleótidos modificados.

En un aspecto, la divulgación se refiere a un oligonucleótido modificado con ANB para la alteración seleccionada de una secuencia de ADN bicatenario. La secuencia de ADN bicatenario contiene una primera secuencia de ADN y una segunda secuencia de ADN. La segunda secuencia de ADN es el complemento de la primera secuencia de ADN y se empareja con ella formando un doblete. El oligonucleótido comprende un dominio que comprende al menos una discrepancia con respecto a la secuencia de ADN bicatenario que ha de ser alterada. Preferentemente, el dominio es la parte del oligonucleótido que es complementaria de la primera cadena que incluye la al menos una discrepancia.

Preferentemente, la discrepancia en el dominio es con respecto a la primera secuencia de ADN. El oligonucleótido comprende una sección que está modificada con al menos un ANB para que tenga una mayor afinidad de enlace que la (parte correspondiente de la) segunda secuencia de ADN. Preferentemente, el al menos un nucleótido modificado es un ANB que está situado a una distancia de al menos un nucleótido con respecto a la al menos una discrepancia; más preferentemente, el oligonucleótido contiene, como máximo, aproximadamente un 75% de nucleótidos modificados.

El dominio que contiene la discrepancia y la sección que contiene el o los nucleótidos modificados pueden estar solapados. Así, en ciertas realizaciones, el dominio que contiene la discrepancia está situado sobre el oligonucleótido en una posición diferente de la sección cuya modificación se considera. En ciertas realizaciones, el dominio incorpora la sección. En ciertas realizaciones, la sección puede incorporar el dominio. En ciertas realizaciones, el dominio y la sección están situados en la misma posición sobre el oligonucleótido y tiene la misma longitud, es decir, coinciden en longitud y posición. En ciertas realizaciones, puede haber más de una sección dentro de un dominio.

Para la presente invención, esto significa que la parte del oligonucleótido que contiene la discrepancia que ha de incorporarse en el doblete de ADN puede situarse en una posición diferente o desplazada de la parte del oligonucleótido que se modifica. En particular, en ciertas realizaciones en las que el sistema de reparación de la célula (o, al menos, las proteínas implicadas en este sistema, o, al menos, las proteínas que están implicadas en el TNE) determina cuál de las cadenas contiene la discrepancia y qué cadena ha de usarse como plantilla para la corrección de la discrepancia.

En ciertas realizaciones, el oligonucleótido comprende una sección que contiene al menos uno, preferentemente al menos 2, más preferentemente al menos tres nucleótidos modificados con ANB. En ciertas realizaciones, la sección sobre el oligonucleótido puede contener más de 4, 5, 6, 7, 8, 9 o 10 nucleótidos modificados con ANB.

En ciertas realizaciones, el al menos un ANB está situado a una distancia de, como máximo, 10 nucleótidos, preferentemente, como máximo, 8 nucleótidos, más preferentemente, como máximo, 6 nucleótidos, aún más preferentemente, como máximo, 4, 3 o 2 nucleótidos con respecto a la discrepancia. En una realización más preferente, el al menos un ANB está situado a una distancia de 1 nucleótido con respecto a la discrepancia; es decir, hay situado un nucleótido entre la discrepancia y el ANB. En ciertas realizaciones relativas a oligonucleótidos que contienen más de un ANB, cada ANB está situado a una distancia de al menos un nucleótido con respecto a la discrepancia. En una realización preferente, los ANB no están situados adyacentes entre sí, sino separados entre sí por al menos un nucleótido, preferentemente dos o tres nucleótidos. En ciertas realizaciones, en el caso de dos o más (números pares de) modificaciones con ANB del oligonucleótido, las modificaciones están separadas una distancia (aproximadamente) igual con respecto a la discrepancia. En otras palabras, preferentemente las modificaciones con ANB están situadas simétricamente en torno a la discrepancia. Por ejemplo, en una realización preferente, dos ANB están situados simétricamente alrededor de la discrepancia a una distancia de 1 nucleótido con respecto a la discrepancia (y de 3 nucleótidos entre sí).

En ciertas realizaciones, como máximo un 50% de los nucleótidos modificados del oligonucleótido son derivados de ANB; es decir, los A, C o G convencionales se sustituyen por su homólogo del ANB, preferentemente como máximo un 40%, más preferentemente como máximo un 30%, aún más preferentemente como máximo un 20%, y lo más preferente, como máximo un 10%.

En ciertas realizaciones, puede introducirse más de una discrepancia, ya sea simultánea o sucesivamente. El oligonucleótido puede acomodar más de una discrepancia en ubicaciones ya sean adyacentes o separadas en el oligonucleótido. Con este fin, el oligonucleótido puede ser adaptado para acomodar un segundo conjunto de ANB que siga los principios esbozados en el presente documento, con la condición de que no interfieran con la mayor capacidad de enlace mutua debido a la conformación particular de los ANB en el oligonucleótido; es decir, preferentemente separados alrededor de la discrepancia a una distancia de 1 nucleótido con respecto a la discrepancia. En ciertas realizaciones, el oligonucleótido puede comprender dos, tres, cuatro o más nucleótidos discrepantes que pueden ser adyacentes o remotos (es decir, no adyacentes). El oligonucleótido puede comprender, además, dominios y secciones adicionales para acomodar esto y, en particular, puede comprender varias secciones. En ciertas realizaciones, el oligonucleótido puede incorporer un inserto potencial que ha de ser insertado en la cadena aceptora. Tal inserto puede variar en longitud desde más de cinco nucleótidos hasta 100. De forma similar, en ciertas realizaciones, pueden introducirse deleciones de variaciones de longitudes similares (de 1 a 100 nucleótidos).

En un aspecto adicional de la divulgación, el diseño del oligonucleótido puede lograrse:

– determinando la secuencia de la cadena aceptora, o al menos de una sección de la secuencia en torno al nucleótido que ha de intercambiarse. Normalmente, esto puede estar en el orden de al menos 10, preferentemente 15, 20, 25 o 30 nucleótidos adyacentes a la discrepancia, preferentemente a cada lado de la discrepancia (por ejemplo, GGGGGGXGGGGGG, siendo X la discrepancia);

– diseñando un oligonucleótido donador que sea complementario de una o ambas secciones adyacentes a la discrepancia y contenga el nucleótido deseado que ha de ser intercambiado (por ejemplo CCCCCCYCCCCCC);

– proporcionando (por ejemplo, por síntesis) el oligonucleótido donador con las modificaciones con ANB en las posiciones deseadas. Las modificaciones pueden variar mucho, dependiendo de las circunstancias. Ejemplos son $CCC^mCC^mCYCC^mCCC^mC$, $CCC^mCCCYCCC^mCCC$, $CCCCCCYCCC^mC^mC^mC^m$, $C^mC^mC^mC^mC^mCYCCCCCC$, $CCCCC^mCYCCC^mCCCCC$, etcétera, representando C^m un resto nucleótido modificado con ANB. Para una

secuencia aceptora diferente, por ejemplo ATGCGTACXGTCCATGAT, pueden diseñarse correspondientes oligonucleótidos donadores, por ejemplo TACGCALGYCLGGTACTA (L=ANB), con una modificación tan variable como se ha esbozado anteriormente en el presente documento;

– sometiendo el ADN que ha de modificarse con el oligonucleótido donador en presencia de proteínas que sean capaces de intercambio de nucleótidos seleccionados, por ejemplo, y en particular, a proteínas que sean funcionales en el mecanismo celular de reparación de discrepancias.

Sin la restricción de consideraciones teóricas, se cree que la afinidad mejorada de enlace aumenta la probabilidad de que un oligonucleótido encuentre su diana y permanezca unido a ella, mejorando así la eficacia del TNE. Muchas modificaciones químicas diferentes del esqueleto o la base del azúcar confieren una afinidad de enlace mejorada. Sin embargo, los presentes inventores decidieron centrarse en oligonucleótidos modificados con ANB y encontraron que su actividad en el TNE dependía de la posición en el oligonucleótido.

El ácido nucleico bloqueado (ANB) es un análogo del ADN con propiedades muy interesantes para su uso en terapia con genes no codificantes. Los ANB son nucleósidos bicíclicos y tricíclicos y análogos de nucleótidos y los oligonucleótidos que contienen tales análogos. Se dan a conocer las características estructuras y funcionales básicas de los ANB y de análogos afines en diversas publicaciones y patentes, incluyendo WO 99/14226, WO 00/56748, WO00/66604, WO 98/39352, la patente estadounidense nº 6.043.060 y la patente estadounidense nº 6.268.490.

Específicamente, combina la capacidad de discriminar entre dianas correctas e incorrectas (alta especificidad), con bioestabilidad muy elevada (baja rotación) y afinidad sin precedentes (fuerza de enlace muy elevada a la diana). De hecho, el aumento de afinidad registrado con el ANB deja las afinidades de todos los análogos previamente documentados en el intervalo de reducida a modesta.

El ANB es un análogo del ARN en el que la ribosa está estructuralmente limitada por un puente de metileno entre el oxígeno 2' y los átomos de carbono 4'. Este puente restringe la flexibilidad del anillo de ribofuranosa y bloquea la estructura en una formación bicíclica rígida. Esta conformación, denominada de tipo N (o 3'-endo), da como resultado un aumento en la T_m del ANB que contiene dobletes y, en consecuencia, mayores afinidades de enlaces y especificidades mayores. En realidad, los estudios espectrales con RMN han demostrado la conformación bloqueada de tipo N del azúcar de ANB, pero también revelaron que los monómeros de ANB son capaces de retorcer sus nucleótidos vecinos no modificados hacia una conformación de tipo N. Resulta importante que las características favorables del ANB no se produzcan a expensas de otras propiedades importantes, según se observa a menudo en análogos de los ácidos nucleicos.

El ANB puede mezclarse libremente con todas las demás entidades químicas que componen el universo de los análogos del ADN. Pueden incorporarse bases del ANB en oligonucleótidos de una longitud de solo secuencias ANB en su totalidad o tan largos como las quimeras de ANB/ADN. Los ANB pueden situarse en posiciones internas 3' o 5'. Sin embargo, debido a sus rígidas conformaciones bicíclicas, los residuos de ANB a veces alteran el retorcimiento helicoidal de las cadenas de ácidos nucleicos. Por ello, generalmente es menos preferible diseñar un oligonucleótido con dos o más residuos adyacentes de ANB. Preferentemente, los residuos de ANB están separados por al menos un nucleótido (modificado) que no altere el retorcimiento helicoidal, tal como un nucleótido convencional (A, C, T o G).

El monómero de ANB originalmente desarrollado y preferente (el monómero de ANB β-D-oxi) ha sido modificado creando nuevos monómeros de ANB. El novedoso ANB α-L-oxi presenta estabilidad superior contra la actividad de la exonucleasa 3', y también es más potente y versátil que el ANB β-D-oxi en el diseño de potentes oligonucleótidos no codificantes. También pueden usarse ANB xilo y ANB L-ribo, según se da a conocer en los documentos WO9914226, WO00/56748, WO00/66604. En la presente invención cualquier ANB de los tipos anteriores es eficaz para lograr las metas de la invención, es decir, mayor eficiencia del TNE, con una preferencia por los análogos de ANB β-D.

En la técnica sobre el TNE, la modificación de ANB ha sido incluida en una lista de posibles modificaciones de oligonucleótidos como alternativa de las moléculas quiméricas usadas en el TNE. Sin embargo, no hay ninguna indicación en la técnica hasta ahora que sugiera que los oligonucleótidos de ADN monocatenario modificados con ANB mejoren significativamente la eficacia del TNE hasta el extremo que se ha hallado presentemente cuando el ANB está situado a una distancia de al menos un nucleótido con respecto a la discrepancia y/o el oligonucleótido no contiene más de aproximadamente un 75% (redondeado al entero más próximo de nucleótidos) de ANB.

El suministro del oligonucleótido puede lograrse mediante electroporación u otras técnicas convencionales que sean capaces de suministrar ya sea al núcleo o al citoplasma. Puede lograrse un ensayo *in vitro* de la presente divulgación usando el sistema libre de células tal como es descrito, *inter alia*, en los documentos WO01/87914, WO03/027265, WO99/58702, WO01/92512.

Tal como se usa en el presente documento, la capacidad del oligonucleótido donador de influir en el TNE depende del tipo, la ubicación y la cantidad de nucleótidos modificados que se incorporen en el oligonucleótido donador. Esta

capacidad puede ser cuantificada, por ejemplo, normalizando la afinidad de enlace (o la energía de enlace (energía libre de Gibbs)) entre nucleótidos convencionales en 1, es decir, para los enlaces tanto AT como GC, la afinidad de enlace se normaliza en 1. Para los oligonucleótidos de la presente invención, la afinidad relativa de enlace (RBA) de cada nucleótido modificado es > 1. Esto se ejemplifica en una fórmula a continuación:

$$RBA = \sum_{n}^{1} RBA(\text{modificado}) - \sum_{m}^{1} RBA(\text{no modificado}) > 0,$$

en la que RBA es la afinidad relativa de enlace total, RBA(modificado) es la suma de la afinidad relativa de enlace del oligonucleótido modificado con una longitud de n nucleótidos y RBA(no modificado) es la suma de la afinidad relativa de enlace del oligonucleótido no modificado con una longitud de m nucleótidos. Por ejemplo, un oligonucleótido de 100 pb contiene 10 modificaciones, cada una con una afinidad relativa de enlace de 1,1. La RBA total es entonces igual a: RBA = [(10*1,1) + (90*1,0)] - (100*1,0) = 1.

Obsérvese que la definición de RBA es, en principio, independiente de la longitud de la cadena de nucleótidos que se compara. Sin embargo, cuando se comparan RBA de cadenas diferentes, se prefiere que las cadenas tengan aproximadamente la misma longitud o que se tomen secciones de longitud comparable. Obsérvese que la RBA no tiene en cuenta que las modificaciones pueden agruparse entre sí en una cadena. Así, un mayor grado de modificación de una cierta cadena A en comparación con una cadena B significa que RBA(A) > RBA(B). Para las secciones corriente arriba y corriente abajo, pueden definirse y usarse valores de RBA correspondientes. Para acomodar el efecto de la posición del nucleótido modificado puede introducirse un factor de ponderación en el valor de RBA. Por ejemplo, el efecto de un nucleótido modificado en el oligonucleótido donador adyacente a la discrepancia puede ser mayor que el de un nucleótido modificado que esté situado a una distancia separada cinco nucleótidos de la discrepancia. En el contexto de la presente divulgación, RBA (donador)> RBA (aceptor).

En ciertas realizaciones, el valor de RBA del donador puede ser al menos 0,1 mayor que el de la RBA del aceptor. En ciertas realizaciones, el valor de RBA del donador puede ser al menos 0,2, 0,3, 0,4, 0,5, 0,6, 0,7, 0,8, 0,9, 1,0, 1,5, 2,0, 2,5 mayor que la RBA del aceptor. Los valores de RBA pueden derivarse del análisis convencional de la afinidad de enlace del nucleótido, tal como mediante modelado molecular, mediciones termodinámicas, etc. Alternativamente, pueden determinarse mediante medición de diferencias de T_m entre cadenas modificadas y no modificadas. Alternativamente, la RBA puede expresar como la diferencia en T_m entre la cadena no modificada y la modificada, ya sea por medición o por cálculo usando fórmulas convencionales para el cálculo de la T_m de un conjunto de nucleótidos, o mediante una combinación de cálculo y mediciones.

Los oligonucleótidos donadores según la divulgación pueden contener modificaciones adicionales para mejorar las características de hibridación, de forma que el donador presente una mayor afinidad hacia la cadena de ADN diana para que la intercalación del donador resulte más fácil. El oligonucleótido donador también puede ser modificado adicionalmente para que se vuelva más resistente a las nucleasas, para estabilizar la estructura triple o cuádruple. La modificación de oligonucleótidos donadores modificados con ANB usados en la invención puede comprender la modificación con fosforotioato, sustituciones de 2-OMe, el uso de ANB adicional en los *termini* 3 y/o 5' del oligonucleótido, APN (ácidos peptidonucleicos), ribonucleótidos y otras bases que modifiquen, preferentemente mejoren, la estabilidad del híbrido entre el oligonucleótido y la cadena aceptora.

Particularmente útiles entre tales modificaciones son los APN, que son análogos de oligonucleótidos en los que el esqueleto de desoxirribosa del oligonucleótido es sustituido por un esqueleto peptídico. Se construye un esqueleto peptídico de ese tipo de unidades de repetición de N-(2-aminoetil) glicina ligadas a través de enlaces amida. Cada subunidad de esqueleto peptídico está unida a una nucleobase (también denominada "base"), que puede ser una base presente de manera natural, no presente de manera natural o modificada. Los oligómeros de APN se enlazan específicamente a una secuencia de ADN o ARN complementarios con mayor afinidad que tanto el ADN como el ARN. En consecuencia, los dobletes resultantes de APN/ADN o APN/ARN tienen temperaturas de fusión (Tm) mayores. Además, la Tm de los dobletes de APN/ADN o APN/ARN es mucho menos sensible a la concentración de sal que los dobletes de ADN/ADN o ADN/ARN. El esqueleto de poliamida de los APN también es más resistente a la degradación enzimática. Se describe la síntesis de los APN, por ejemplo, en los documentos WO 92/20702 y WO 92/20703. Se ilustran otros APN, por ejemplo, en el documento WO93/12129 y en la patente estadounidense nº 5.539.082, expedida el 23 de julio de 1996. Además, muchas publicaciones científicas describen la síntesis de los APN, así como sus propiedades y usos. Véanse, por ejemplo, Patel, Nature, 1993, 365, 490; Nielsen y otros, Science, 1991, 254, 1497; Egholm, J. Am. Chem. Soc., 1992, 114, 1895; Knudson y otros, Nucleic Acids Research, 1996, 24, 494; Nielsen y otros, J. Am. Chem. Soc., 1996, 118, 2287; Egholm y otros, Science, 1991, 254, 1497; Egholm y otros, J. Am. Chem. Soc., 1992, 114, 1895; y Egholm y otros, J Am. Chem. Soc., 1992, 114, 9677.

También hay modificaciones útiles adicionales de los oligonucleótidos de ANB conocidas como Súper A y Súper T, obtenibles en Epoch Biosciences, Alemania. Estos nucleótidos modificados contienen un sustituyente adicional que se adhiere en el surco principal del ADN, en el que se cree que mejora el apilamiento de bases en el doblete de ADN.

En realizaciones adicionales, pueden obtenerse resultados ventajosos cuando, además de los oligonucleótidos modificados con ANB, se introducen modificaciones adicionales en el oligonucleótido que mejoren aún más la afinidad del oligonucleótido por la cadena aceptora. Así, se ha descubierto que el oligonucleótido modificado con ANB usado en la presente invención que, además, comprende pirimidina modificada con propino C5 y/o purines modificadas con propinilo C7 mejora significativamente la eficacia del TNE.

Los oligonucleótidos donadores de la divulgación también pueden ser creados quiméricos, es decir, contener secciones de ADN, ARN, ANB, APN o de combinaciones de los mismos.

Así, en ciertas realizaciones, el oligonucleótido de la invención contiene, además, otros nucleótidos modificados, opcionalmente no metilados.

En ciertas realizaciones, el oligonucleótido es resistente a las nucleasas. Esto resulta ventajoso para evitar que el oligonucleótido sea degradado por nucleasas y aumenta la probabilidad de que el oligonucleótido donador pueda encontrar su (molécula aceptora) diana.

En ciertas realizaciones de la divulgación, puede modificarse el nucleótido del oligonucleótido en la posición de la discrepancia. Que pueda modificarse o no la discrepancia dependerá en buena medida del mecanismo exacto del intercambio de nucleótidos seleccionados o de que el mecanismo celular de reparación de ADN use la diferencia en la afinidad entre las cadenas donadora y aceptore. Lo mismo es válido para la ubicación exacta de las otres posiciones modificadas en las inmediaciones o el vecindario de la discrepancia. Sin embargo, con base en la divulgación presentada en este documento, tal oligonucleótido puede ser diseñado y comprobado inmediatamente, teniendo en cuenta los procedimientos de ensayo pare oligonucleótidos adecuados, tal como se describe en otro lugar del presente documento. En ciertas realizaciones, no se modifica el nucleótido en la posición de la discrepancia. En ciertas realizaciones, la modificación está en una posición alejada a un nucleótido, preferentemente a 2, 3, 4, 5, 6 o 7 nucleótidos con respecto a la discrepancia. En ciertas realizaciones, la modificación se sitúa en una posición corriente debajo de la discrepancia. En ciertas realizaciones, la modificación se sitúa en una posición corriente arriba de la discrepancia. En ciertas realizaciones, la modificación está situada entre 10 pb y 10 kb de la discrepancia, preferentemente entre 50 y 5000 pb, más preferentemente entre 100 y 500 pb de la discrepancia.

Los oligonucleótidos que se usan como donadores pueden variar en longitud, pero generalmente varían en longitud entre 10 y 500 nucleótidos, con una preferencia por 11 a 100 nucleótidos, preferentemente de 15 a 90, más preferentemente de 20 a 70, siendo lo más preferente de 30 a 60 nucleótidos.

En un aspecto, la divulgación se refiere a un procedimiento para la alteración seleccionada de una secuencia de ADN aceptor bicatenario que comprende la combinación de la secuencia de ADN aceptor bicatenario con un oligonucleótido donador, conteniendo la secuencia de ADN aceptor bicatenario una primere secuencia de ADN y una segunda secuencia de ADN que es el complemento de la primera secuencia de ADN, y comprendiendo el oligonucleótido donador un dominio que comprende al menos una discrepancia con respecto a la secuencia de ADN aceptor bicatenario que ha de ser alterada, preferentemente con respecto a la primera secuencia de ADN, y modificándose una sección del oligonucleótido donador con ANB para expresar un mayor grado de afinidad con la primera secuencia de ADN en comparación con un nucleótido no modificado en esa posición del oligonucleótido, en presencia de proteínas que sean capaces de intercambio de nucleótidos seleccionados, estando situado el ANB a una distancia de al menos un nucleótido con respecto a la discrepancia.

La divulgación es, en su forma más amplia, aplicable genéricamente a todo tipo de organismos tales como seres humanos, animales, plantas, peces, reptiles, insectos, hongos, bacterias, etcétera. La divulgación es aplicable pare la modificación de cualquier tipo de ADN, tal como ADN derivado de ADN genómico, ADN lineal, cromosomas artificiales, ADN cromosómico nuclear, ADN cromosómico de orgánulos, cromosomas artificiales bacterianos y cromosomas artificiales de levadura. La divulgación puede ser realizada *in vivo*, así como *ex vivo*.

La divulgación es, en su forma más amplia, aplicable para muchos fines para alterar una célula, corregir una mutación mediante la restauración a la forma natural, inducir una mutación, desactivar una enzima mediante alteración de la región codificante, modificar la bioactividad de una enzima alterando la región codificante, modificar una proteína alterando la región codificante.

La divulgación también versa sobre el uso de oligonucleótidos, esencialmente tal como se describe en lo que antecede del presente documento, pare alterar una célula, corregir una mutación mediante la restauración a la forma natural, inducir una mutación, desactivar una enzima mediante alteración de la región codificante, modificar la bioactividad de una enzima alterando la región codificante, modificar una proteína alterando la región codificante, reparación de discrepancias, alteración seleccionada de material genético (vegetal), incluyendo mutación de genes, reparación de genes seleccionados y bloqueo de genes.

La divulgación versa, además, acerca de *kits*, que comprenden uno o más oligonucleótidos, según se define en otra parte del presente documento, opcionalmente en combinación con proteínas que son capaces de inducir MRM y, en particular, que son capaces de TNE.

La divulgación versa, además, acerca de material genético modificado obtenido por medio del procedimiento de la presente divulgación, acerca de células y organismos que comprenden el material genético modificado, y acerca de plantas o partes de plantas que se obtienen así.

La divulgación versa en particular acerca del uso del procedimiento de TNE usando los oligonucleótidos modificados con ANB, según se da a conocer en el presente documento, para proporcionar resistencia a los herbicidas en plantas. También se dan a conocer plantas que han sido dotadas de resistencia a los herbicidas, en particular el glifosato y/o herbicidas de sulfonilurea, tal como clorsulfurón.

Descripción de las figuras

Figura 1: Representación esquemática del intercambio de nucleótidos seleccionados. Se pone en contacto una cadena de ADN bicatenario aceptor que contiene un nucleótido (X) que ha de intercambiarse con un oligonucleótido donador modificado ANB (dado esquemáticamente como $NNN^{m}NNN^{m}YNN^{m}NN^{m}$) que contiene el nucleótido (Y) que ha de insertarse. La estructura triple es sometida a un entorno, o puesta en contacto con el mismo, que es capaz de TNE o, al menos, con proteínas que son capaces de llevar a cabo el TNE, tales como las conocidas como la mezcla de enzimas libre de células o un extracto libre de células (véanse, *inter alia*, los documentos WO99/58702, WO01/73002).

Figura 2: Estructuras químicas de diversos ANB.

Figura 3: La eficacia de reparación por TNE de oligonucleótidos que contienen nucleótidos modificados con ANB según se miden usando el ensayo libre de células. Para cada experimento se determinó la eficacia de la reparación usando el oligonucleótido de ADN normal y se fijó en un valor de 1. El número de aumentos indica el incremento en reparación visto usando oligonucleótidos que contienen ANB β-D en comparación con la eficacia de reparación obtenida cuando se usa el oligonucleótido de ADN normal.

Ejemplo

Materiales y procedimientos

Se compraron en Eurogentec oligonucleótidos que contenían ANB. Las secuencias de los oligos usados se muestran a continuación. El plásmido usado en los experimentos fue un derivado de pCR2.1 (Invitrogen) que contiene genes que confieren resistencia tanto a la kanamicina como a la carbenicilina. Se introdujeron codones finalizadores y deleciones dentro del marco de lectura en el ORF de la kanamicina y la carbenicilina, según se ha descrito previamente (Sawano y otros, 2000 Nucleic Acids Res. 28: e78). El plásmido KmY22stop tiene una mutación de TAT a TAG en el codón Y22 en el ORF de la kanamicina. En el plásmido KmY22, se delecionó el tercer nucleótido del codón Y22 (TAT), dando un desplazamiento en el marco de lectura.

Genes defectuosos de kanamicina y los oligonucleótidos usados en el sistema libre de células:

```
Km WT      GAG AGG CTA TTC GGC TAT GAC TGG GCA CAA CAG
            E   R   L   F   G   Y   D   W
KmY22stop  GAG AGG CTA TTC GGC TAG GAC TGG GCA CAA CAG
            E   R   L   F   G   *
KmY22Δ     GAG AGG CTA TTC GGC TA_ GAC TGG GCA CAA CAG
            E   R   L   F   G   *
```

Oligo	Secuencia	ANB/ADN	ID SEC
L1	tgtgcccagtCgTagccgaatagc	2/24 (8,3%)	1
L2	tgtgcccagTcgtAgccgaatagc	2/24 (8,3%)	2
L3	TgTgCcCaGtCgTaGcCgAaTaGc	12/24 (50%)	3
L4	tGtGcCcAgTcGtAgCcGaAtAgC	12/24 (50%)	4
L5	tGtgcCcagTcgtAgccGaatAgc	6/24 (25%)	5
L6	tgtgCccagTcgtaGccgaAtagc	4/24 (16,6%)	

Se muestran la secuencia relevante de los marcos de lectura abierta de la kanamicina y los aminoácidos codificados. Se introdujeron las mutaciones de un solo nucleótido que producen un codón finalizador (TAG, *) según se ha descrito anteriormente (Sawano y otros, 2000 Nucleic Acids Res. 28: e78). Se muestran en mayúsculas las

secuencias de los oligonucleótidos ANB usados en los experimentos. Los oligonucleótidos L1-L6 se usaron para convertir la mutación KmY22stop y KmY22Δ en un codón alternativo codificante de tirosina (TAC). Se subraya el nucleótido discrepante en cada oligonucleótido. Se subrayan las regiones de enlace de oligonucleótidos en el ORF de la kanamicina. Los oligonucleótidos L1-L6 son complementarios de la secuencia de codificación de la kanamicina.

Los ensayos libres de células se llevaron a cabo como sigue. Se recogieron yemas florales de *Arabidopsis thaliana* (ecotipo Col-0) y se molieron en atmósfera de nitrógeno. Se añadieron 200 µl de tampón de aislamiento de proteínas (20 mM HEPES pH 7,5, 5 mM KCl, 1,5 mM $MgCl_2$, 10mM DTT, 10% (v/v) glicerol, 1% (w/v) PVP). Se peletizaron los restos vegetales mediante centrifugación a 14k RPM durante 30 minutos y se almacenó el sobrenadante a -80°C. Se midió la concentración de proteínas usando el *kit* NanoOrange (Molecular Probes, Inc.). Un aislamiento típico dio como resultado una concentración de proteínas de aproximadamente 3-4 µg/µl. Las reacciones libres de células contenían los componentes siguientes: 1 µg ADN plasmídico (KmY22stop o KmY22Δ), 100 ng de oligonucleótido, 30 µg de proteína vegetal total, 4 µl de ADN de esperma cizallado de salmón (3 µg/µl), 2 µl de mezcla inhibidora de proteasas (conc. 50×: comprimidos Complete de cóctel inhibidor de proteasas libre de EDTA, Roche Diagnostics), 50 µl de tampón de reacción 2× libre de células (400 mM Tris pH 7,5, 200 mM $MgCl_2$, 2 mM DTT, 0,4mM espermidina, 50 mM ATP, 2 mM de cada uno de CTP, GTP, UTP, 0,1 mm de cada uno de dNTP y 10 mM NAD) compensados con agua hasta un volumen total 100 µl. Se incubó la mezcla a 37°C durante 1 hora. Después se aisló como sigue el ADN plasmídico. Se añadieron 100 µl de H_2O a cada reacción para aumentar el volumen, seguido por 200 µl de fenol con tampón alcalino (pH 8-10). Esto se sometió brevemente a agitación vorticial y luego se centrifugó a 13k rpm durante 3 minutos. Se transfirió la fase superior acuosa a un nuevo tubo y se añadieron entoncas 200 µl de cloroformo. Esto fue sometido brevemente a agitación vorticial, centrifugado a 13k rpm durante 3 minutos y la fase acuosa se transfirió a un nuevo tubo. Se precipitó el ADN mediante la adición de 0,7 volúmenes de 2-propanol y la perla fue resuspendida en TE. Para eliminar cualquier oligonucleótido copurificado, se hizo pasar el ADN por una columna de purificación de PCR Qiagen y se eluyó el ADN plasmídico en un volumen final de 30 µl. Se electroporaron 2µl de ADN plasmídico en 18 µl de células electrocompetentes DH10B (Invitrogen). Después de la electroporación, se permitió que las células se recuperaran en un medio de SOC durante 1 hora a 37°C. Después de este periodo, se añadió kanamicina hasta una concentración de 100 µg/ml y las células fueron incubadas durante 3 horas adicionales. El medio sólido contenía 100 µg/ml de kanamicina o carbenicilina. Para los experimentos con KmY22stop y KmY22, se detectó el número de eventos de TNE sobre el medio de kanamicina y se calculó la eficacia de electroporación contando el número de colonias obtenidas a partir de una disolución de 10^{-4} y 10^{-5} de la electroporación dispuesta en placas sobre el medio de carbenicilina. Se calculó la eficacia del TNE dividiendo el número de eventos de TNE por el número total de células transformadas.

Resultados

Los oligonucleótidos fueron diseñados para producir una única sustitución de nucleótido (KmY22stop) o inserción (KmY22A) en el codón finalizador (TAG) introducido en el ORF de la kanamicina para que el codón codifique nuevamente el aminoácido correcto.

En cada experimento se usaron en paralelo oligonucleótidos de ADN no modificados y oligonucleótidos modificados con ANB. En cada experimento, se estableció arbitrariamente como 1 la eficacia del TNE obtenida usando el oligonucleótido de ADN normal, y la eficacia del TNE de los oligonucleótidos modificados con ANB fue expresada subsiguientemente como un número de aumentos con respecto al oligonucleótido de ADN normal. Se encontró que el aumento en la eficacia de la reparación dependía de la posición de los ANB en el oligonucleótido. El oligonucleótido L1 contenía nucleótidos que flanqueaban el nucleótido discrepante, y esto no presentó ninguna mejora con respecto a un oligonucleótido de ADN. Sin embargo, el oligonucleótido L2, con los nucleótidos de ANB separados de la discrepancia por un nucleótido adicional, presentaron un aumento medio de 5 veces. La adición de nucleótidos de ANB extra (L3 y L4) disminuye la eficacia de la reparación por debajo de la de un oligonucleótido de ADN normal hasta el nivel de fondo, y estos oligonucleótidos son biológicamente inactivos. Esto es confirmado por los datos que usan L5 y L6. En L5, además de los ANB que flanquean los nucleótidos discrepantes como en L2, también contiene nucleótidos adicionales de ANB. En este caso, no se observa el aumento en reparación obtenido usando L2, presumiblemente debido a los efectos inhibidores de los nucleótidos adicionales de ANB. L6 también presenta mejora en la reparación cuando se usa KmY22stop. Se observa la misma tendencia cuando los experimentos se llevan a cabo usando KmY22Δ. Se sabe que la reparación mediante inserciones de nucleótidos únicos es menos eficaz que la reparación mediante sustituciones, y esto es también lo que se observa aquí. L2 presenta un aumento en la frecuencia de reparación, lo que muestra que, también para las inserciones, la posición de los nucleótidos de ANB alrededor de la discrepancia es una característica importante para aumentar la frecuencia de reparación.

En la presente divulgación, los experimentos demuestran que, usando un ensayo de TNE *in vitro*, el sistema libre de células, los oligonucleótidos que contienen nucleótidos de ANB muestran mayores niveles de TNE en comparación con la eficacia del TNE obtenida usando oligonucleótidos de ADN normal. Esta mejora puede ser de hasta 5 veces. El efecto es en buena medida dependiente de la posición de los nucleótidos de ANB con respecto al nucleótido discrepante. Además, el proceso de reparación es muy sensible al número de nucleótidos de ANB en el oligonucleótido: cuando este alcanza el 50%, el oligonucleótido expresa una actividad biológicamente reducida en el ensayo. Puede funcionalizarse adicionalmente otra forma de nucleótidos de ANB, los análogos de ANB 2'-amino

(Rosenbohm y otros, (2003) Org Biomol Chem. 1, 655-663), por la adición de otros grupos químicos al nucleótido. Además de la mayor afinidad de enlace, tales nucleótidos de ANB tienen grupos químicos adicionales que pueden interactuar con el ADN de muchas maneras y que aumentan adicionalmente la afinidad de enlace (Sorensen y otros, (2003) Chem Commun (Camb) 17, 2130-2131). Tal ANB 2'-amino puede aumentar adicionalmente la reparación por encima del aumento de 5 veces ya mostrado.

LISTADO DE SECUENCIAS

<110> Keygene NV

<120> Intercambio de nucleótidos seleccionados mejorado con oligonucleótidos modificados con ANB

<130> P27711PC03

<150> PCT/NL2006/000244
<151> 2006-05-09

<150> PCT/NL2005/000884
<151> 2005-12-22

<160> 6

<170> PatentIn versión 3.3

<210> 1
<211> 24
<212> ADN
<213> artificial

<220>
<223> Oligonucleótido de TNE modificado con ANB

<220>
<221> base_modificada
<222> (11)..(11)
<223> ANB-Citosina

<220>
<221> base_modificada
<222> (13)..(13)
<223> ANB-Tirosina

<400> 1
tgtgcccagt cgtagccgaa tagc 24

<210> 2
<211> 24
<212> ADN
<213> artificial

<220>
<223> Oligonucleótido de TNE modificado con ANB

<220>
<221> base_modificada
<222> (10)..(10)
<223> ANB-Tirosina

<220>
<221> base_modificada
<222> (14)..(14)
<223> ANB-Adenina

<400> 2
tgtgcccagt cgtagccgaa tagc 24

<210> 3
<211> 24
<212> ADN
<213> artificial

<220>
<223> Oligonucleótido de TNE modificado con ANB

<220>

<221> base_modificada
<222> (1)..(1)
<223> ANB-Tirosina

<220>
<221> base_modificada
<222> (3)..(3)
<223> ANB-Tirosina

<220>
<221> base_modificada
<222> (5)..(5)
<223> ANB-Citosina

<220>
<221> base_modificada
<222> (7)..(7)
<223> ANB-Citosina

<220>
<221> base_modificada
<222> (9)..(9)
<223> ANB-Guanina

<220>
<221> base_modificada
<222> (11)..(11)
<223> ANB-Citosina

<220>
<221> base_modificada
<222> (13)..(13)
<223> ANB-Tirosina

<220>
<221> base_modificada
<222> (15)..(15)
<223> ANB-Guanina

<220>
<221> base_modificada
<222> (17)..(17)
<223> ANB-Citosina

<220>
<221> base_modificada
<222> (19)..(19)
<223> ANB-Adenina

<220>
<221> base_modificada
<222> (21)..(21)
<223> ANB-Tirosina

<220>
<221> base_modificada
<222> (23)..(23)
<223> ANB-Guanina

<400> 3
tgtgcccagt cgtagccgaa tagc 24

<210> 4
<211> 24
<212> ADN
<213> artificial

<220>
<223> Oligonucleótido de TNE modificado con ANB

<220>
<221> base_modificada
<222> (2)..(2)

<223> ANB-Guanina

<220>
<221> base_modificada
<222> (4)..(4)
<223> ANB-Guanina

<220>
<221> base_modificada
<222> (6)..(6)
<223> ANB-Citosina

<220>
<221> base_modificada
<222> (8)..(8)
<223> ANB-Adenina

<220>
<221> base_modificada
<222> (10)..(10)
<223> ANB-Tirosina

<220>
<221> base_modificada
<222> (12)..(12)
<223> ANB-Guanina

<220>
<221> base_modificada
<222> (14)..(14)
<223> ANB-Adenina

<220>
<221> base_modificada
<222> (16)..(18)
<223> ANB-Citosina

<220>
<221> base_modificada
<222> (18)..(18)
<223> ANB-Guanina

<220>
<221> base_modificada
<222> (20)..(20)
<223> ANB-Adenina

<220>
<221> base_modificada
<222> (22)..(22)
<223> ANB-Adenina

<220>
<221> base_modificada
<222> (24)..(24)
<223> ANB-Citosina

<400> 4
tgtgcccagt cgtagccgaa tagc 24

<210> 5
<211> 24
<212> ADN
<213> artificial

<220>
<223> Oligonucleótido de TNE modificado con ANB

<220>
<221> base_modificada
<222> (2)..(2)
<223> ANB-Guanina

<220>
<221> base_modificada
<222> (6)..(6)
<223> ANB-Citosina

<220>
<221> base_modificada
<222> (10)..(10)
<223> ANB-Tirosina

<220>
<221> base_modificada
<222> (14)..(14)
<223> ANB-Adenina

<220>
<221> base_modificada
<222> (18)..(18)
<223> ANB-Guanina

<220>
<221> base_modificada
<222> (22) .. (22)
<223> ANB-Adenina

<400> 5
tgtgcccagt cgtagccgaa tagc 24

<210> 6
<211> 24
<212> ADN
<213> artificial

<220>
<223> Oligonucleótido de TNE modificado con ANB

<220>
<221> base_modificada
<222> (5)..(5)
<223> ANB-Citosina

<220>
<221> base_modificada
<222> (10)..(10)
<223> ANB-Tirosina

<220>
<221> base_modificada
<222> (15)..(15)
<223> ANB-Guanina

<220>
<221> base_modificada
<222> (20)..(20)
<223> ANB-Adenina

<400> 6
tgtgcccagt cgtagccgaa tagc 24

REIVINDICACIONES

1. Un procedimiento para la alteración seleccionada de una secuencia de ADN aceptor bicatenario que comprende la combinación de la secuencia de ADN aceptor bicatenario con un oligonucleótido donador en presencia de proteínas que sean susceptibles de intercambio de nucleótidos seleccionados, en el que la secuencia de ADN aceptor bicatenario contiene una primera secuencia de ADN y una segunda secuencia de ADN que es el complemento de la primera secuencia de ADN y en el que el oligonucleótido donador comprende un dominio que comprende al menos una discrepancia con respecto a la secuencia de ADN aceptor bicatenario que ha de ser alterada, preferentemente con respecto a la primera secuencia de ADN, y en el que el nucleótido en la discrepancia no está modificado, en el que el oligonucleótido contiene más de un ANB, en el que cada ANB está situado a una distancia de al menos un nucleótido con respecto a la discrepancia, y en el que el oligonucleótido comprende una sección que contiene dos ANB situados simétricamente alrededor de la discrepancia a una distancia de un nucleótido con respecto a la discrepancia, en el que el procedimiento no es para el tratamiento del cuerpo humano o el cuerpo animal mediante cirugía o terapia, y en el que el procedimiento no es para la alteración seleccionada del ADN en seres humanos.

2. El procedimiento según la reivindicación 1 en el que al menos el 50% de los nucleótidos del oligonucleótido son derivados de ANB.

3. El procedimiento según la reivindicación 1 en el que, en el oligonucleótido 2, y no más, nucleótidos son ANB.

4. El procedimiento según una cualquiera de las reivindicaciones precedentes en el que el oligonucleótido tiene una longitud entre 10 y 500 nucleótidos.

5. El procedimiento según una cualquiera de las reivindicaciones precedentes en el que la alteración está dentro de una célula seleccionada preferentemente del grupo constituido por una célula vegetal, una célula fúngica, una célula de roedor, una célula de primate, una célula humana o una célula de levadura.

6. El procedimiento según una cualquiera de las reivindicaciones 1-4 en el que las proteínas están derivadas de un extracto celular.

7. El procedimiento según la reivindicación 6 en el que el extracto celular se selecciona del grupo constituido por un extracto de células vegetales, un extracto de células fúngicas, un extracto de células de roedor, un extracto de células de primate, un extracto de células humanas o un extracto de células de levadura.

8. El procedimiento según una cualquiera de las reivindicaciones 1-4 en el que la alteración es una deleción, una sustitución o una inserción de al menos un nucleótido.

9. El procedimiento según una cualquiera de las reivindicaciones precedentes en el que el ADN diana procede de hongos, bacterias, plantas, mamíferos o seres humanos.

10. El procedimiento según una cualquiera de las reivindicaciones precedentes en el que el ADN bicatenario procede de ADN genómico, ADN lineal, cromosomas artificiales de mamífero, cromosomas artificiales bacterianos, cromosomas artificiales de levadura, cromosomas artificiales vegetales, ADN cromosómico nuclear, ADN cromosómico de orgánulos o ADN episomático.

11. El procedimiento según una cualquiera de las reivindicaciones precedentes para alterar una célula, corregir una mutación mediante la restauración a la forma natural, inducir una mutación, desactivar una enzima mediante alteración de la región codificante, modificar la bioactividad de una enzima alterando la región codificante o modificar una proteína alterando la región codificante.

12. El uso de un oligonucleótido según se describe en una cualquiera de las reivindicaciones 1 – 4, para alterar una célula, corregir una mutación mediante la restauración a la forma natural, inducir una mutación, desactivar una enzima mediante alteración de la región codificante, modificar la bioactividad de una enzima alterando la región codificante, modificar una proteína alterando la región codificante, reparar discrepancias, la alteración seleccionada de material genético (vegetal), incluyendo mutación de genes, reparación de genes seleccionados y bloqueo de genes, en el que el uso no es para el tratamiento del cuerpo humano o el cuerpo animal mediante cirugía o terapia, y en el que el uso no es para la alteración seleccionada del ADN en seres humanos.

Fig 1

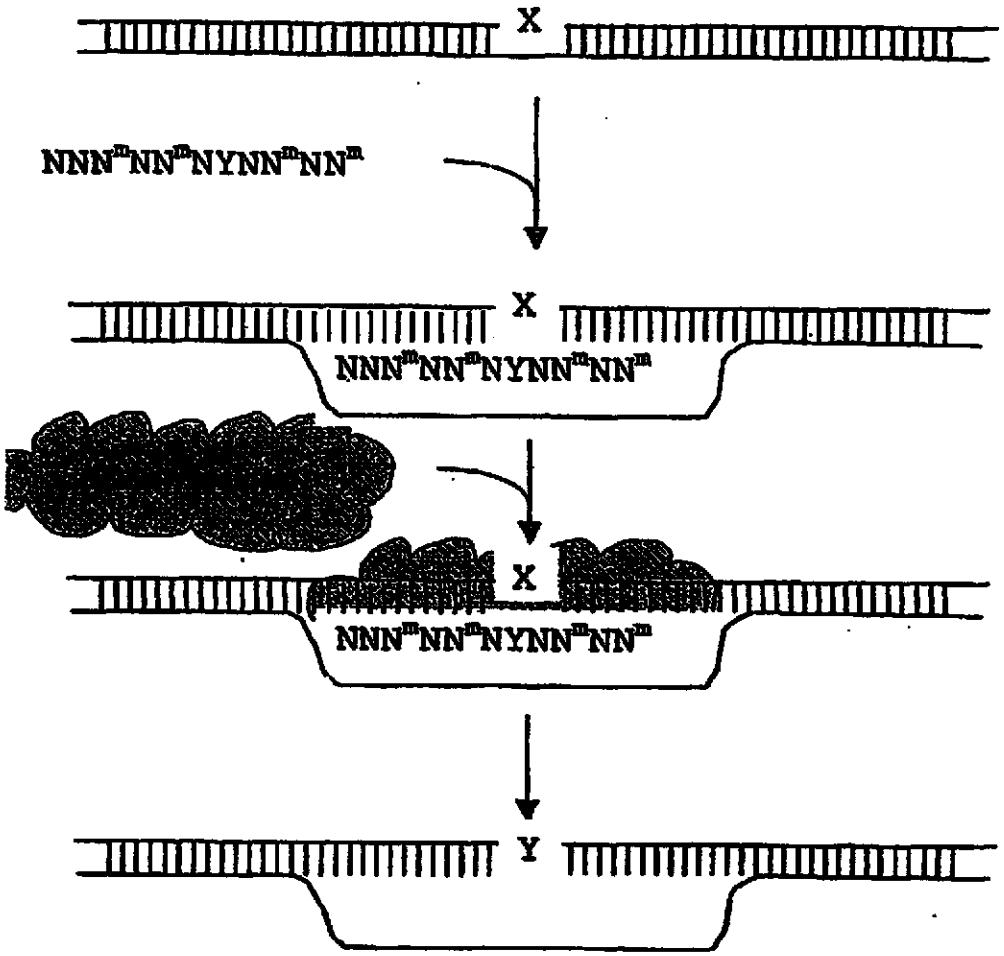
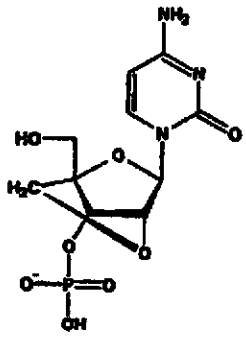
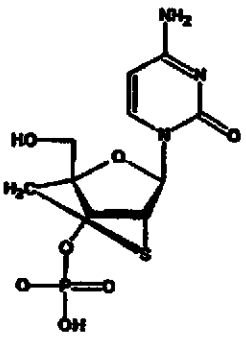


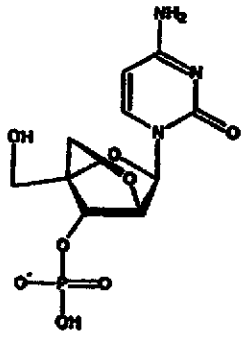
Fig 2



ANB β-D-oxi



ANB β-D-tio



ANB α-L-oxi

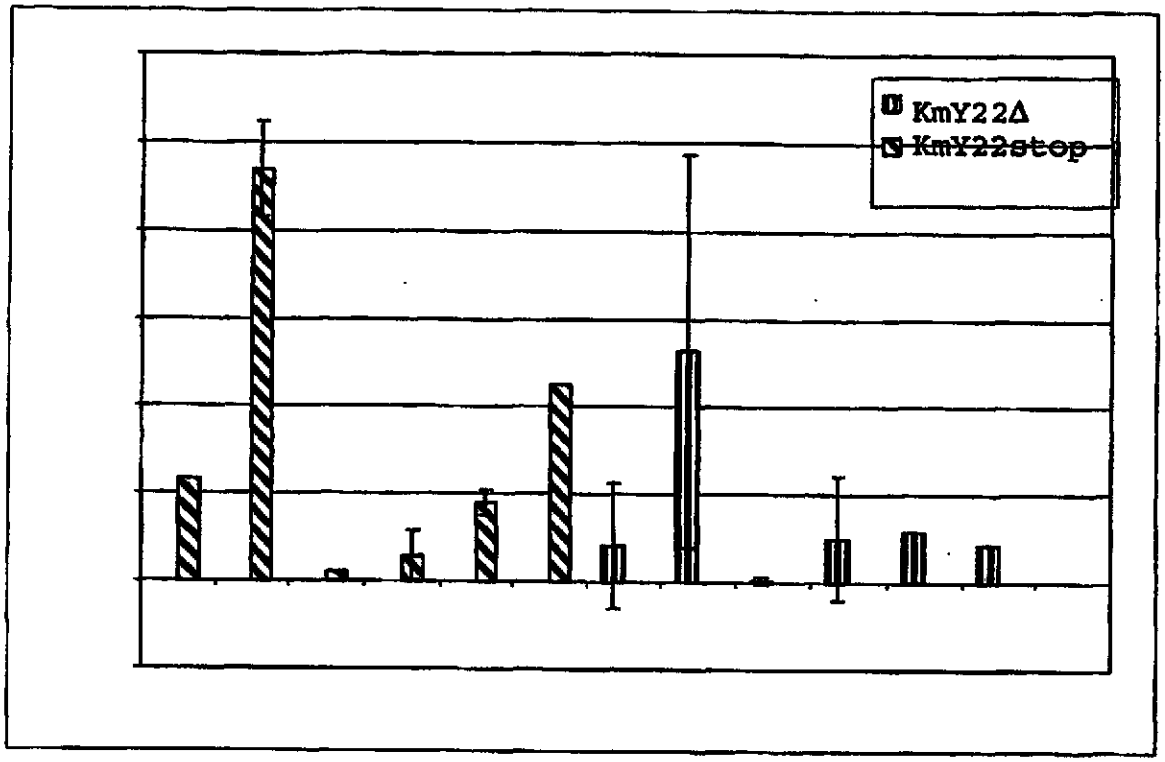



Fig 3