

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 536 638**

51 Int. Cl.:

C12N 15/10 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **25.11.2011 E 11791641 (1)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **18.02.2015 EP 2646549**

54 Título: **Alteración dirigida de ADN**

30 Prioridad:

02.12.2010 US 419179 P
03.12.2010 NL 2005808

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
27.05.2015

73 Titular/es:

KEYGENE N.V. (100.0%)
P.O. Box 216
6700 AE Wageningen, NL

72 Inventor/es:

BUNDOCK, PAUL y
LHUISSIER, FRANCK

74 Agente/Representante:

PONTI SALES, Adelaida

ES 2 536 638 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).

DESCRIPCIÓN

Alteración dirigida de ADN

5 **Campo técnico**

[0001] La presente invención se refiere a un procedimiento para la alteración dirigida de ADN aceptor, por ejemplo ADN aceptor de doble cadena. El procedimiento comprende el uso de un oligonucleótido que tiene un desapareamiento con respecto al ADN aceptor (doble cadena) dirigido. Este desapareamiento se encuentra en posiciones específicas en dicho oligonucleótido. También se proporciona un kit que comprende instrucciones para realizar el procedimiento según las invenciones, y en una realización preferida, comprende un oligonucleótido adecuado para su uso en el procedimiento.

15 **Antecedentes de la invención**

[0002] La modificación genética es el proceso de crear deliberadamente cambios en el material genético de células vivas. A menudo, el objetivo es modificar una propiedad biológica codificada genéticamente de esa célula, o del organismo del cual la célula forma parte o en el que se puede regenerar. Estos cambios pueden tomar la forma de eliminación de partes del material genético, la adición de material genético exógeno, o cambios en la secuencia de nucleótidos existente del material genético, por ejemplo mediante la sustitución de un nucleótido por otro.

[0003] Los procedimientos para la modificación genética de organismos eucariotas se conocen desde hace más de 20 años, y han encontrado una amplia aplicación en células vegetales, humanas y animales y microorganismos para mejoras en los campos de la agricultura, la salud humana, la calidad alimentaria y la protección del medio ambiente.

[0004] Una metodología de modificación genética común consiste en añadir fragmentos de ADN exógeno al genoma de una célula, que puede entonces conferir una nueva propiedad a esa célula u organismo sobre y por encima de las propiedades codificadas por genes ya existentes (incluyendo aplicaciones en las que la expresión de genes existentes será así suprimida).

[0005] Aunque estos procedimientos pueden tener cierta eficacia en proporcionar las propiedades deseadas a una diana, sin embargo, estos procedimientos no son muy precisos. No existe, por ejemplo, ningún control sobre las posiciones genómica en la que se insertan los fragmentos de ADN exógeno (y por tanto sobre los niveles últimos de expresión). Además, el efecto deseado tendrá que manifestarse por sí mismo sobre las propiedades naturales codificadas por el genoma original y bien equilibrado. Por el contrario, los procedimientos de modificación genética que darán lugar a la adición, delección o conversión de nucleótidos en loci genómico predefinido permitirán la modificación precisa y controlable de genes existentes.

[0006] El intercambio seleccionado de nucleótidos dirigido por oligonucleótidos (TNE) es un procedimiento que se basa en la liberación en la célula eucariota de oligonucleótidos (sintéticos) (moléculas que constan de tramos cortos de nucleótidos y/o grupos de tipo nucleótido que se asemejan a ADN en sus propiedades de apareamiento de bases Watson-Crick, pero que pueden ser químicamente diferentes del ADN; (Alexeev y Yoon, 1998); (Rice et al, 2001); (Kmiec, 2003)).

[0007] Mediante el diseño deliberado de un nucleótido con un desapareamiento en la secuencia de homología del oligonucleótido, el nucleótido con un desapareamiento puede inducir cambios en la secuencia de ADN genómica a la que se puede hibridar el nucleótido. Este procedimiento permite la conversión de uno o más nucleótidos en la diana, y puede aplicarse, por ejemplo, para crear codones de parada en genes existentes, dando lugar a una perturbación de su función, o para crear cambios de codón, dando lugar a genes que codifican proteínas con composición de aminoácidos alterada (ingeniería de proteínas).

[0008] El intercambio seleccionado de nucleótidos (TNE) se ha descrito en muchos organismos, incluyendo plantas, animales y células de levadura y también se conoce como mutagénesis dirigida por oligonucleótidos (ODM).

[0009] Los primeros ejemplos de TNE que utilizaron oligonucleótidos quiméricos ADN:ARN provenían de células animales (revisado en (Igoucheva et al, 2001)). El TNE utilizando oligonucleótidos quiméricos ADN:ARN también se ha demostrado en células de plantas (Beetham et al, 1999; Kochevenko y Willmitzer, 2003; Okuzaki y Toriyama, 2004; Zhu et al, 2000; Zhu et al., 1999). En general, las frecuencias descritas en ambos estudios de plantas y animales eran demasiado bajas para la aplicación práctica de TNE en loci cromosómicos no seleccionables. El TNE utilizando oligonucleótidos quiméricos también se encontró que era difícil de reproducir (Ruiter et al., 2003), dando lugar a una búsqueda de diseños de oligonucleótidos alternativos que proporcionen resultados más fiables.

[0010] Varios laboratorios se han centrado en el uso de oligonucleótidos de cadena única (ss) para TNE. Se ha encontrado que éstos proporcionan resultados más reproducibles tanto en células vegetales como animales (Liu et al., 2002) (Parekh-Olmedo et al., 2005) (Dong et al., 2006). Sin embargo, el mayor problema al que se enfrenta la aplicación de TNE en células de, en particular, los organismos superiores, tales como plantas, sigue siendo la baja eficacia relativa

que se ha descrito hasta el momento. En el maíz se ha descrito una frecuencia de conversión de 1×10^{-4} (Zhu et al., 2000). Estudios posteriores en el tabaco (Kochevenko y Willmitzer, 2003) y el arroz (Okuzaki y Toriyama, 2004) han descrito frecuencias de 1×10^{-6} y 1×10^{-4} , respectivamente.

5 **[0011]** El TNE utilizando diversos tipos de oligonucleótidos ha sido objeto de varias solicitudes de patentes y patentes, incluyendo US6936467, US7226785, US579597, US6136601, US2003/0163849, US2003/0236208, WO03/013226, US5594121 y WO01/92512.

10 **[0012]** En US6936467 se contempla que la baja eficacia de la alteración del gen obtenida usando oligonucleótidos de ADN no modificado es el resultado de la degradación de los oligonucleótidos de los donantes por las nucleasas presentes en la mezcla de reacción o la célula diana. Se propone incorporar nucleótidos modificados que hacen que los oligonucleótidos resultantes sean (más) resistentes frente a las nucleasas. Estas modificaciones se describen que están situadas preferiblemente en los extremos del oligonucleótido, mientras que el desapareamiento está presente al menos a 8 nucleótidos de cada extremo terminal.

15 **[0013]** El documento US7226785 describe también procedimientos para alteraciones genómicas cromosómicas dirigidas utilizando oligonucleótidos monocatenarios modificados con al menos una región terminal resistente a nucleasa modificada. El TNE utilizando oligonucleótidos de cadena única modificados es también el objetivo de WO02/26967.

20 **[0014]** El documento WO2010/017932 describe un oligonucleótido que comprende un nucleótido modificado entre 2-10 nucleótidos del extremo 3' del oligonucleótido, cuyo oligonucleótido se utiliza en un procedimiento de realización de una reacción de extensión con cebadores según el documento WO2010/017932. Olsen et al. (2005, J, Gene Med. 7: 1534-1544) describen que la síntesis de ADN está implicada en alteraciones genéticas específicas de sitio inducidas por oligonucleótidos de cadena única en células de mamífero seleccionadas.

25 **[0015]** Debido a la baja eficacia de los procedimientos actuales de TNE, sigue habiendo una necesidad de técnicas de TNE alternativas y/o mejores. Éstas pueden usarse solas o en combinación con técnicas de TNE existentes, tales como las descritas anteriormente y en la técnica, para mejorar la eficacia. En consecuencia, los presentes inventores pretenden mejorar la tecnología de TNE existente.

30 **Descripción resumida de la invención**

Problema técnico

35 **[0016]** El problema técnico identificado en la técnica es que la metodología disponible actualmente para la introducción de cambios genéticos específicos y deseados en las células, por ejemplo para la introducción de cambios genéticos específicos en el genoma presente en una célula vegetal, se ve obstaculizada por la baja eficacia, haciendo que las técnicas sean laboriosas y costosas. Existe la necesidad de llegar a técnicas de TNE alternativas y mejores.

40 **[0017]** Por lo tanto, uno de los problemas a resolver es proporcionar un procedimiento alternativo y/o mejor y/o adicional para la introducción de un cambio o cambios genéticos en la información genética, en particular, en secuencias de ADN de doble cadena, tal como está presente en las células. Preferiblemente, dicho procedimiento tiene una eficacia mejorada en comparación con los descritos en la técnica. Dicho procedimiento permitiría la disposición de células con información genética alterada, más en particular células en las que una funcionalidad de la célula ha sido modificada mediante la introducción de la alteración en el ADN diana. Dicha funcionalidad, por ejemplo, puede referirse a propiedades alteradas de la proteína codificada por una secuencia de ADN que abarca el ADN que ha sido alterado mediante el procedimiento según la invención.

50 **La solución al problema**

55 **[0018]** Los presentes inventores han encontrado un nuevo procedimiento para la alteración dirigida de una secuencia de ADN de doble cadena. El procedimiento utiliza un oligonucleótido donante que comprende un dominio que es capaz de hibridarse a la diana (bajo condiciones que permiten la hibridación, tal como son conocidas por un experto). El nucleótido donante comprende además al menos un desapareamiento en comparación con la secuencia de ADN de doble cadena dirigida, cuyo desapareamiento se introducirá en la secuencia de ADN de doble cadena dirigida.

60 **[0019]** Aunque en la técnica se aboga y es de conocimiento común que el desapareamiento debe estar presente en el oligonucleótido, en otras palabras "en algún lugar en el medio" del oligonucleótido (véase por ejemplo las diversas solicitudes de patente descritas anteriormente, en particular, US6936467 y US7226785), se ha encontrado, sorprendente e inesperadamente, que el TNE se puede realizar con buena eficacia cuando el desapareamiento no se encuentra en algún lugar del medio del oligonucleótido, sino en lugares específicos. En particular, se ha encontrado que para un TNE eficaz, el desapareamiento se encuentra como máximo dos, preferiblemente como máximo un nucleótido del extremo 3' de un oligonucleótido. Lo más preferiblemente, dicho al menos un desapareamiento se encuentra en el extremo 3' del oligonucleótido (ss).

65

[0020] En contraste con la creencia general de que cualquier desapareamiento debe estar en la parte central de un oligonucleótido, y que, por ejemplo, las modificaciones en el extremo 5' y el extremo 3' del oligonucleótido debe introducirse para prevenir la degradación prematura del oligonucleótido por nucleasas (véase, por ejemplo US6936467), ahora se encontró que tener un desapareamiento en el oligonucleótido cero, uno o como máximo dos nucleótidos(s) desde el extremo 3' proporciona oligonucleótidos que se pueden utilizar ventajosamente en los procedimientos de intercambio seleccionado de nucleótidos, es decir, en los procedimientos para la alteración dirigida de una secuencia de ADN de doble cadena.

[0021] Además, el oligonucleótido que comprende dicho al menos un desapareamiento cero, uno o como máximo dos nucleótidos del extremo 3' puede modificarse adicionalmente mediante la inclusión de nucleótidos modificados, es decir, nucleótidos que tienen una modificación de bases, una modificación del esqueleto, una modificación de azúcares y/o una modificación en el extremo 3' y/o el extremo 5' de dicho nucleótido. Estas modificaciones incluyen modificaciones bien conocidas para mejorar la unión/hibridación del oligonucleótido con la secuencia diana y/o para prevenir o inhibir la degradación del oligonucleótido por las denominadas nucleasas. Los ejemplos de dichos nucleótidos modificados incluyen ácidos nucleicos bloqueados, o nucleótidos que tienen enlaces fosforotioato. Sin embargo, tal como se muestra en el ejemplo 3, no se requiere que el oligonucleótido incorpore nucleótidos que tienen enlaces fosforotioato ni es necesario que se incorpore cualquier otro tipo de nucleótido modificado.

Breve descripción de los dibujos

[0022]

La figura 1 muestra la secuencia de nucleótidos de la ORF de GFP que contiene un codón de parada (SEQ ID NO: 1). La figura 2 muestra la secuencia de aminoácidos de la proteína GFP-STOP, con la posición del codón de parada representada por el asterisco (SEQ ID NO: 2). La figura 3 es una representación esquemática de las construcciones utilizadas en este estudio. La figura 4 muestra la reparación de GFP episomal por diferentes oligonucleótidos, analizados en al menos tres experimentos independientes. La figura 5 muestra la secuencia de nucleótidos de la construcción YFP-STOP. El nucleótido en la posición 186 ha sido alterado (C a A), dando lugar a un codón de parada en marco (SEQ ID NO: 3). La figura 6 muestra la secuencia de proteína de YFP-STOP. La posición del codón de parada en la proteína está indicada por un asterisco (SEQ ID NO: 4). La figura 7 muestra el TNE en el plásmido YFP episomal en protoplastos de tomate. 7460 muestra la eficacia de transformación utilizando solo el gen YFP de tipo salvaje. 7461 + PB212 indica la eficacia de reparación cuando la construcción 35S YFP-STOP se cointrodujo en los protoplastos de tomate junto con el oligonucleótido PB212. La figura 8 muestra que un oligonucleótido según la invención, incluso sin ninguna modificación del tipo enlaces PS, aumenta la eficacia del TNE.

Definiciones

[0023] En la siguiente descripción y ejemplos, se utilizan una serie de términos. Con el fin de proporcionar una comprensión clara y consistente de la memoria y las reivindicaciones, incluyendo el alcance que debe darse a tales términos, se proporcionan las siguientes definiciones. A menos que se defina lo contrario en este documento, todos los términos técnicos y científicos utilizados tienen el mismo significado que se entiende habitualmente por un experto ordinario en la técnica a la que pertenece esta invención. Las descripciones de todas las publicaciones, solicitudes de patente, patentes y otras referencias se incorporan en este documento en su totalidad como referencia.

[0024] Tal como se utiliza en este documento, las formas singulares "un", "una" y "el/la" incluyen referentes plurales a menos que el contexto indique claramente lo contrario. Por ejemplo, un procedimiento para aislar "una" molécula de ADN, tal como se utiliza anteriormente, incluye el aislamiento de una pluralidad de moléculas (por ejemplo, decenas, centenas, miles, decenas de miles, centenas de miles, millones, o más moléculas).

[0025] Los procedimientos de realización de las técnicas convencionales utilizadas en el procedimiento de la invención serán evidentes para el experto en la materia. La práctica de técnicas convencionales en biología molecular, bioquímica, química computacional, cultivo celular, ADN recombinante, bioinformática, genómica, secuenciación y campos relacionados son bien conocidos por los expertos en la técnica y se discuten, por ejemplo, en las siguientes referencias bibliográficas: Sambrook et al, Molecular Cloning. A Laboratory Manual, 2ª edición, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, Nueva York, 1989; Ausubel et al, Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley & Sons, Nueva York, 1987 y actualizaciones periódicas; y la serie Methods in Enzymology, Academic Press, San Diego.

[0026] Un ácido nucleico según la presente invención puede incluir cualquier polímero u oligómero de bases de pirimidina y purina, preferiblemente citosina, timina y uracilo, y adenina y guanina, respectivamente (véase Albert L. Lehninger, Principles of Biochemistry, en 793-800 (Worth Pub. 1982) que se incorpora aquí por referencia en su totalidad para todos los propósitos). La presente invención contempla cualquier componente desoxirribonucleótido, ribonucleótido o ácido nucleico peptídico, y cualquier variante química de los mismos, tales como las formas metiladas, hidroximetiladas o glicosiladas de estas bases, y similares. Los polímeros u oligómeros pueden ser heterogéneos u

homogéneos en su composición, y pueden aislarse de fuentes naturales o se pueden producir artificial o sintéticamente. Además, los ácidos nucleicos pueden ser ADN o ARN, o una mezcla de los mismos, y pueden existir de manera permanente o transitoria en forma de una sola cadena o de doble cadena, incluyendo doble cadena homogénea, doble cadena heterogénea y estados híbridos. Oligonucleótido (sintético): moléculas de ADN de una sola cadena que tienen preferiblemente de aproximadamente 5 a aproximadamente 150 bases, que pueden sintetizarse químicamente se denominan como oligonucleótidos sintéticos. En general, estas moléculas de ADN sintéticas están diseñadas para tener una secuencia de nucleótidos única o deseada, aunque es posible sintetizar familias de moléculas que tienen secuencias relacionadas y que tienen diferentes composiciones de nucleótidos en posiciones específicas dentro de la secuencia de nucleótidos. El término oligonucleótido sintético se utilizará para referirse a moléculas de ADN que tienen una secuencia de nucleótidos diseñada o deseada. "Intercambio seleccionado de nucleótidos" o "TNE": Intercambio seleccionado de nucleótidos (TNE) es un proceso por el cual un oligonucleótido sintético, al menos parcialmente complementario a un sitio en un gen cromosómico o un gen episomal dirige la inversión de un nucleótido en un sitio específico. El TNE se ha descrito usando una amplia variedad de oligonucleótidos y dianas. Algunos de los oligonucleótidos descritos son quimeras de ARN/ADN, contienen modificaciones terminales para impartir resistencia a nucleasa.

Descripción detallada de la invención

[0027] En un aspecto, la invención se refiere a un procedimiento para la alteración dirigida de una secuencia de ADN aceptor de doble cadena.

[0028] El procedimiento comprende combinar una/la secuencia de ADN aceptor de doble cadena con un oligonucleótido donante. El oligonucleótido comprende un dominio que es capaz de hibridarse a la primera secuencia de ADN (bajo condiciones que permiten la hibridación, conocidas por el experto). El dominio que es capaz de hibridarse a la primera secuencia de ADN comprende al menos un desapareamiento con respecto a la primera secuencia de ADN. Dicho al menos un desapareamiento se encuentra como máximo 2, preferiblemente como máximo 1 nucleótido, del extremo 3' de dicho oligonucleótido. Lo más preferiblemente, dicho al menos un desapareamiento está en el extremo 3' del oligonucleótido.

[0029] El procedimiento según la invención permite la alteración específica y selectiva de uno o más nucleótidos en (a) sitio o sitios específicos de una secuencia de ADN aceptor mediante oligonucleótidos. En particular, la alteración dirigida se puede realizar dentro de una célula diana que contiene la secuencia de ADN aceptor de doble cadena mediante la introducción en la célula de un oligonucleótido según la invención, es decir, que tiene, en comparación con la primera secuencia de ADN, al menos un desapareamiento y en el que dicho al menos un desapareamiento se encuentra como máximo 2, preferiblemente como máximo 1 nucleótido del extremo 3' de dicho oligonucleótido. Lo más preferiblemente, dicho al menos un desapareamiento está en el extremo 3' del oligonucleótido. El resultado del procedimiento es la alteración dirigida de uno o más nucleótidos, de manera que se altera la secuencia de la secuencia del ADN diana. La invención se puede realizar preferiblemente in vivo, pero también se puede realizar ex vivo o in vitro.

[0030] En el contexto de la presente invención, la secuencia de ADN de doble cadena comprende 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 a la misma para formar la doble cadena. Por ejemplo, un complemento de una primera secuencia de ADN ATTT (en la dirección 5' a 3') es TAAA (en la dirección 3' a 5'). Esta segunda secuencia de ADN se empareja a la primera secuencia de ADN para formar una doble cadena. En caso de que la secuencia de ADN de doble cadena sea, por ejemplo, parte de un gen, la primera secuencia de ADN puede ser una la cadena con sentido o cadena anti-sentido.

[0031] El ADN de la secuencia de ADN de doble cadena puede ser cualquier tipo de ADN, tal como ADN genómico, ADN derivado de ADN genómico, ADN lineal, cromosomas artificiales, ADN cromosómico nuclear, ADN de orgánulos, BAC, YAC, ADN plásmido, o ADN episomal. La secuencia de ADN puede ser parte de un intrón o un exón, codificante o no codificante, que regula la expresión o no.

[0032] El oligonucleótido utilizado en el procedimiento descrito en el presente documento es preferiblemente de cadena única y comprende al menos un dominio que es capaz de hibridarse con la primera secuencia de ADN. Dicho al menos un desapareamiento con respecto a la secuencia de ADN de doble cadena a alterar y cuyo desapareamiento se encuentra 0, 1 ó 2 nucleótidos del extremo 3' del oligonucleótido, está comprendido en el dominio que es capaz de hibridarse a la primera secuencia de ADN o está directamente adyacente al dominio.

[0033] Dicho al menos un dominio puede comprender por tanto al menos un desapareamiento con respecto a la secuencia de ADN de doble cadena a alterar o es directamente el siguiente/está adyacente al desapareamiento. En otras palabras, el oligonucleótido comprende un dominio que consiste en nucleótidos adyacentes que se puede hibridar, bajo las condiciones del experimento, con la primera secuencia de ADN de la secuencia de ADN aceptor de doble cadena, y, comprende un desapareamiento con respecto a dicha primera secuencia de ADN o el desapareamiento se encuentra directamente junto a dicho dominio (y en el que el desapareamiento se encuentra 0, 1 ó 2 nucleótidos del extremo 3' del oligonucleótido).

[0034] Por ejemplo, si el dominio se encuentra (en la dirección 5' a 3') hasta 3 nucleótidos del extremo 3', el desapareamiento puede estar directamente junto al dominio 2 nucleótidos del extremo 3' del oligonucleótido.

[0035] Por ejemplo, si el dominio se encuentra (en la dirección 5' a 3') hasta 1 nucleótido del extremo 3', el desapareamiento puede estar comprendido en el dominio, por ejemplo, situado 2 nucleótidos del extremo 3', o estar directamente adyacente al dominio, es decir, situado 0 nucleótidos del extremo 3', en otras palabras en el extremo 3' del oligonucleótido.

[0036] Debe entenderse por el experto que en el contexto de la presente invención, y cuando se hace referencia al desapareamiento o al desapareamiento comprendido en el dominio que es capaz de hibridarse con la primera secuencia de ADN, éstos incluyen cualquier desapareamiento comprendido en el dominio o situado directamente adyacente al dominio, siempre que el desapareamiento se encuentre 2, 1 ó 0 nucleótidos del extremo 3' del oligonucleótido.

[0037] En ciertas realizaciones, el oligonucleótido comprende preferiblemente no más de un desapareamiento. En ciertas realizaciones, se puede introducir más de una mutación en el ADN diana, ya sea simultánea o sucesivamente. El oligonucleótido puede acomodar más de un desapareamiento en posiciones adyacentes o alejadas en el oligonucleótido. En ciertas realizaciones, el oligonucleótido puede comprender dos, tres, cuatro o más nucleótidos desapareados que pueden estar adyacentes o alejados (es decir, no adyacentes). El oligonucleótido puede comprender otros dominios para acomodar a éstos. Los desapareamientos pueden estar en el mismo dominio o en diferentes dominios.

[0038] Se entenderá por el experto que el oligonucleótido según la invención puede comprender además partes que no se hibridan, en otras palabras, nucleótidos adyacentes que no se hibridan con la primera secuencia de ADN, por ejemplo, cuando estas partes no son complementarias a ninguna secuencia en la primera secuencia de ADN.

[0039] En una realización preferida, el oligonucleótido comprende un dominio que es capaz de hibridarse a la primera secuencia de ADN y comprende, o está directamente adyacente a al menos un desapareamiento, preferiblemente un desapareamiento, con respecto a la secuencia de ADN de doble cadena a alterar. En dicha realización, el oligonucleótido puede comprender, en principio, más de un dominio que es capaz de hibridarse a la primera secuencia de ADN, sin embargo, sólo uno de los dominios puede comprender, o estar directamente adyacente a, dicho al menos un desapareamiento (o el desapareamiento), tal como se describe en el presente documento. En otra realización preferida, el oligonucleótido comprende sólo un dominio que puede hibridarse con el ADN de doble cadena. Dicho dominio se encuentra cerca de o en el extremo 3' del oligonucleótido e incluye el desapareamiento, o está directamente adyacente al desapareamiento.

[0040] Los oligonucleótidos que se utilizan como donantes en el procedimiento descrito en el presente documento pueden variar en longitud, pero en general varían en una longitud entre 10 y 500 nucleótidos, con preferencia por 11 a 100 nucleótidos, preferiblemente de 15 a 90, más preferiblemente de 20 a 70.

[0041] El dominio puede consistir en al menos 5 nucleótidos, incluyendo el desapareamiento, pero también puede consistir en todos los nucleótidos, incluyendo el desapareamiento, del oligonucleótido. En caso de que el desapareamiento se encuentre directamente adyacente al dominio, el dominio puede consistir en al menos 5 nucleótidos, pero también puede consistir en todos los nucleótidos del oligonucleótido, a excepción del desapareamiento. El dominio o dominios en el oligonucleótido están habitualmente en el orden de al menos 5, 10, preferiblemente 15, 20, 25 ó 30 nucleótidos.

[0042] El oligonucleótido según la invención comprende al menos un desapareamiento que se encuentra como máximo 2, preferiblemente como máximo 1 nucleótido del extremo 3' de dicho oligonucleótido. Lo más preferiblemente, dicho (al menos un) desapareamiento está en el extremo 3' del oligonucleótido. Un experto en la técnica entiende lo que abarca el término extremo 3'. Una molécula de ADN no circular de cadena única tiene dos extremos, el extremo 3' y el extremo 5' (también referidos como "extremo tres prima" y "extremo cinco prima").

[0043] El extremo 5' de un ácido nucleico de cadena única designa el nucleótido específico del cual el átomo de carbono C-5 forma el átomo de carbono terminal del esqueleto de azúcar-fosfato. El átomo de carbono C-5 puede o no puede estar unido a un grupo fosfato mediante un enlace fosfodiéster, pero este grupo fosfato a su vez no forma ninguna unión con otro nucleótido. El extremo 3' de un ácido nucleico de cadena única designa el nucleótido específico del cual el átomo de carbono C-3 no está unido a ningún otro nucleótido, ya sea por medio de un enlace diéster de fosfato o de otra manera. El átomo C-5 es el quinto átomo de carbono de la molécula de ribosa o desoxirribosa y no forma parte del anillo de furanosa, empezando a contar desde el átomo de C directamente adyacente tanto al oxígeno del anillo de furanosa como a la nucleobase. El átomo C-3 es el tercer átomo de carbono de la molécula de ribosa o desoxirribosa y forma parte del anillo de furanosa, empezando a contar desde 1 que es el átomo de C directamente adyacente tanto al oxígeno del anillo de furanosa como a la nucleobase.

[0044] El término "desapareamiento situado 2 nucleótidos del extremo 3'" indica que el desapareamiento está dos nucleótidos desde el nucleótido en el extremo 3' del oligonucleótido. El término "desapareamiento situado 1 nucleótido

del extremo 3'" indica que el desapareamiento está un nucleótido desde el nucleótido en el extremo 3' del oligonucleótido. El término "desapareamiento situado 0 nucleótidos desde el extremo 3'" indica que el desapareamiento es el nucleótido en el extremo 3' del oligonucleótido.

5 **[0045]** En ciertas realizaciones, el oligonucleótido donante utilizado en el procedimiento según la invención es complementario a la primera secuencia de ADN con la excepción de dicho al menos un desapareamiento, por ejemplo, con la excepción de uno, dos, tres o cuatro desapareamientos en el oligonucleótido.

10 **[0046]** En ciertas realizaciones preferidas, el oligonucleótido es complementario a la primera secuencia de ADN en toda la longitud del oligonucleótido, a excepción del desapareamiento situado como máximo 2, preferiblemente como máximo 1 nucleótido del extremo 3' de dicho oligonucleótido, lo más preferiblemente dicho desapareamiento está en el extremo 3' del oligonucleótido. En otra realización, el oligonucleótido es (en la dirección 5' a 3') complementario a la primera secuencia de ADN en toda la longitud del oligonucleótido hasta la posición del desapareamiento (situado 2, 1 ó 0 nucleótidos del extremo 3').

15 **[0047]** En ciertas realizaciones, el oligonucleótido utilizado en el procedimiento según la invención comprende al menos una sección que contiene al menos un nucleótido modificado que tiene una modificación de base, una modificación de bases del extremo 3' y/o 5', una modificación del esqueleto o una modificación de azúcares.

20 **[0048]** La modificación de bases, modificaciones de bases en los extremos 3' y/o 5', modificación del esqueleto, y/o modificaciones de azúcares pueden incorporarse en los oligonucleótidos para aumentar la afinidad de (unión/hibridación) de los oligonucleótidos a la secuencia diana y, ya sea de forma independiente o adicionalmente, para aumentar la resistencia de los oligonucleótidos frente a las nucleasas celulares. Sin embargo, tal como se muestra en el ejemplo 3, no se requiere que el oligonucleótido incorpore cualquier nucleótido modificado.

25 **[0049]** Puede utilizarse ventajosamente cualquier modificación de un nucleótido en un oligonucleótido que proporciona un oligonucleótido adecuado para su uso en el procedimiento según la invención (y que comprende al menos un desapareamiento situado como máximo 2, preferiblemente como máximo 1 nucleótido del extremo 3' de dicho oligonucleótido, lo más preferiblemente dicho desapareamiento está en el extremo 3' del oligonucleótido). Se entenderá por un experto que una modificación es con respecto a uno cualquiera de un nucleótido A, C, T, G natural.

30 **[0050]** Ventajosamente, aunque no es esencial para la invención, el oligonucleótido para el uso en el procedimiento según la invención puede comprender nucleótidos modificados que incrementan la resistencia del oligonucleótido frente a nucleasas celulares, si se compara con los nucleótidos naturales A, T, C y G. Estas modificaciones pueden incluir modificaciones de bases, modificaciones del esqueleto, y/o modificaciones de azúcares. Habitualmente, dichos nucleótidos modificados que aumentan la resistencia del oligonucleótido frente a las nucleasas celulares pueden dar lugar a un aumento de la estabilidad del oligonucleótido en un entorno celular, que puede dar lugar a un mejor intercambio dirigido de nucleótidos. Preferiblemente, el oligonucleótido para uso según el procedimiento de la invención comprende al menos 1, preferiblemente al menos 2, más preferiblemente al menos 4, más preferiblemente al menos 6, más preferiblemente al menos 8 nucleótidos modificados que aumentan la resistencia del oligonucleótido frente a las nucleasas celulares si se compara con los nucleótidos naturales A, T, C y G. Alternativamente, o al mismo tiempo, el oligonucleótido para uso según el procedimiento de la invención comprende como máximo 25, preferiblemente como máximo 20, más preferiblemente como máximo 15, lo más preferiblemente como máximo 10 nucleótidos modificados que aumentan la resistencia del oligonucleótido frente a las nucleasas celulares si se compara con los nucleótidos naturales A, T, C y G. Dichos nucleótidos modificados pueden situarse en cualquier posición dentro del oligonucleótido, preferiblemente dentro de 20 nucleótidos, preferiblemente dentro de 15, más preferiblemente dentro de 10, incluso más preferiblemente dentro de 8, aún más preferiblemente dentro de 6 nucleótidos del extremo 3' y/o el extremo 5' del oligonucleótido, y lo más preferiblemente en los últimos nucleótidos en el extremo 3' y/o en los últimos nucleótidos en el extremo 5'. Si el desapareamiento que se va a incorporar en la secuencia de ADN diana se encuentra cero, uno, o como máximo dos nucleótidos del extremo 3' del oligonucleótido, se prefiere particularmente que dicho nucleótido o nucleótidos modificados protejan la parte 3' frente a nucleasas celulares y por lo tanto se encuentren en el extremo 3' del oligonucleótido, tal como dentro de 20, 15, 10, 9, 8, 7, 6, ó 4 nucleótidos del extremo 3'. Sin embargo, tal como se describió anteriormente, y como se muestra en el ejemplo 3, no es esencial para la invención que el oligonucleótido incluya de hecho nucleótidos modificados que aumentan la resistencia del oligonucleótido frente a las nucleasas celulares.

55 **[0051]** Varios de dichos nucleótidos modificados se mencionan en el presente documento, que aumentan la resistencia del oligonucleótido frente a las nucleasas celulares si se compara con los nucleótidos naturales A, T, C, y G y que se pueden incorporar en el oligonucleótido para el uso en el procedimiento según la invención. Dicho nucleótido modificado puede ser un nucleótido que tiene un enlace o enlaces fosforotioato, pero también puede ser una fosforamidita, un metilfosfonato, o un nucleótido con enlaces internucleotídicos no fosfatados, tales como carbonatos, carbamatos, siloxano, sulfonamidas y ácido nucleico de poliamida. Además, se pueden usar nucleótidos modificados que confieren resistencia a las nucleasas celulares tal como se describe en WO0226967, tales como LNA (Locked Nucleic Acid), o cualquier otro nucleótido modificado que mejora la resistencia a las nucleasas celulares del oligonucleótido tal como se conoce por el experto.

[0052] Alternativamente o adicionalmente a los nucleótidos modificados que confieren resistencia a las nucleasas descritos anteriormente, el oligonucleótido para el uso en el procedimiento según la invención puede comprender nucleótidos modificados que tienen una mayor afinidad de unión a la secuencia de ADN diana si se compara con los nucleótidos naturales A, T, C y G. Estas modificaciones pueden incluir modificaciones de bases, modificaciones del esqueleto, y/o modificaciones de azúcares. Habitualmente, dichos nucleótidos modificados que tienen una mayor afinidad de unión afectarán el apareamiento de bases más fuerte con la secuencia diana, lo que puede dar lugar a un aumento de la estabilidad del híbrido entre el oligonucleótido y la secuencia diana, que se cree que da lugar a un mejor intercambio dirigido de nucleótidos. Preferiblemente, el oligonucleótido para uso según el procedimiento de la invención comprende al menos 1-10, preferiblemente 1-8, más preferiblemente 1-6, incluso más preferiblemente 1-4, tales como 1, 2, 3, ó 4, incluso más preferiblemente 2 nucleótidos modificados que tienen una mayor afinidad de unión a la secuencia de ADN diana si se compara con los nucleótidos naturales A, T, C y G. Dichos nucleótidos modificados tal como se mencionó anteriormente se pueden encontrar en cualquier posición dentro del oligonucleótido, preferiblemente en una posición de un nucleótido de distancia del desapareamiento, preferiblemente como máximo 2, 3, 4, 5, 6, ó 7 nucleótidos de distancia del desapareamiento. Preferiblemente, dicho nucleótido modificado se encuentra en el lado 5' del desapareamiento, pero también puede optar por la posición de dicho nucleótido modificado en el lado 3' del desapareamiento si el desapareamiento no se encuentra en el último nucleótido en el extremo 3' del oligonucleótido.

[0053] Varios ejemplos de dichos nucleótidos modificados que tienen una mayor afinidad de unión a la secuencia de ADN diana si se compara con los nucleótidos naturales A, T, C y G, se mencionan en este documento que se pueden incorporar en el oligonucleótido para su uso en el procedimiento según la invención, incluyendo sustitución 2-OMe, LNA (Locked Nucleic Acid), ribonucleótido, superA, superT, o cualquier otro tipo de nucleótido modificado que mejora la afinidad de unión del oligonucleótido a la secuencia de ADN diana si se compara a la de los nucleótidos naturales A, T, C y G, como es conocido por un experto.

[0054] La determinación de si un nucleótido modificado confiere una mayor resistencia frente a las nucleasas celulares si se compara con los nucleótidos naturales A, T, C y G puede realizarse, por ejemplo, mediante la comparación de los tiempos de de semivida de un oligonucleótido que tiene dicho nucleótido modificado con un oligonucleótido que no tiene dicho nucleótido modificado, en presencia de nucleasas celulares como, por ejemplo, presentes en el extracto de tomate, las células de tomate, o en *E. coli*. Si el tiempo de semivida del primer mencionado es mayor, dicho nucleótido modificado confiere mayor resistencia frente a las nucleasas celulares si se compara con los nucleótidos naturales A, T, C y G. La determinación de si un nucleótido modificado confiere una mayor afinidad de unión a la secuencia de ADN diana si se compara con los nucleótidos naturales A, T, C y G o puede realizarse, por ejemplo, mediante la comparación de la temperatura de fusión (Tf) de la doble cadena formada entre el oligonucleótido que tiene dicho nucleótido modificado y su diana sobre la formada por el oligonucleótido que no tiene dicho nucleótido modificado y su diana. Si la temperatura de fusión del primer mencionado es mayor, dicho nucleótido modificado confiere mayor afinidad de unión a la secuencia de ADN diana si se compara con los nucleótidos naturales A, T, C y G.

[0055] Una sección según la presente invención se debe entender como cualquier parte del oligonucleótido con una longitud de al menos un nucleótido. Por ejemplo, una sección puede comprender 1-10, preferiblemente 1-6, más preferiblemente 1-4, más preferiblemente 1-2 nucleótidos, y pueden situarse en el lado 3' y/o el lado 5' del desapareamiento. Dicho al menos una sección puede ser parte de un dominio según la invención; en otras palabras, la sección puede estar en un dominio que puede hibridarse con la primera secuencia de ADN. Alternativamente, la sección puede solaparse con un dominio, ya sea total o parcialmente. En caso de solapamiento completo la sección puede tener la misma longitud del dominio, pero también puede tener una longitud que supere la longitud del dominio. En el caso de solapamiento parcial, el dominio y la sección comparten al menos un nucleótido.

[0056] Dependiendo del tipo de modificación utilizada en el oligonucleótido puede haber una preferencia por el nucleótido modificado para ser parte de un dominio que puede hibridarse con la primera o segunda secuencia de ADN, y cuyo dominio comprende o está directamente adyacente a dicho al menos un desapareamiento situado como máximo 2, preferiblemente como máximo 1 nucleótido del extremo 3' de dicho oligonucleótido, lo más preferiblemente dicho desapareamiento está en el extremo 3' del oligonucleótido. Este es, en particular, el caso para los nucleótidos modificados con una mayor afinidad de unión en comparación con los nucleótidos A, C, T o G naturales con su nucleótido complementario.

[0057] Las modificaciones de bases incluyen, pero sin limitación, modificaciones tales como, por ejemplo, las descritas en WO226967, incluyendo modificaciones en la posición C-5 de pirimidinas, tales como 2'-desoxiuridina, 5-fluoro-2'-desoxiuridina, 5-bromo-2'-desoxiuridina y 5-metil-2'-desoxicitidina. Otras modificaciones de bases incluyen nucleobases sintéticas y naturales como 5-metilcitosina, 5-hidroximetil citosina, xantina, hipoxantina, 2-aminoadenina, 6-metil y otros derivados de alquilo de adenina y guanina, 2-propil y otros derivados de alquilo de adenina y guanina, 2-tiouracilo, 2-tiotimina, 2-tiocitosina, 5-halouracilo y citosina, 5-propinil uracilo y citosina, 6-azo uracilo, citosina y timina, 5-uracilo, 4-tiouracilo, 8-halo, 8-amino, 8-tiol, 8-tioalquilo, 8-hidroxilo y otras adeninas y guaninas 8-sustituidos, 5-halo, particularmente 5-bromo, 5-trifluorometil y otros uracilos y citosinas 5-sustituidos, 7-metilguanina y 7-metiladenina, 8-azaguanina y 8-azaadenina, 7-desazaguanina y 7-desazaadenina y 3-desazaguanina y 3-desazaadenina.

[0058] Las modificaciones en los extremos (3' y/o 5') pueden incluir bases de 2'-O-metilo, grupos 3' amina, enlaces fosfortioato, o cualquier otra modificación que sea resistente a la nucleasa. El experto es muy consciente de este tipo

de modificaciones. Proporcionar resistencia a nucleasa se cree que mejora aún más el intercambio dirigido de nucleótidos.

5 [0059] Las diversas modificaciones del esqueleto, tales como las mencionados en WO226967, incluyendo fosforotioatos, fosforamiditas y metilfosfonatos, y aquellas con enlaces internucleotídicos no fosfatados, tales como carbonatos, carbamatos, siloxano, sulfonamidas y ácido nucleico de poliamida aumentarán la resistencia a las nucleasas celulares. Dichas modificaciones del esqueleto son por lo tanto útiles en el oligonucleótido utilizado en el procedimiento según la invención.

10 [0060] Además, las modificaciones de azúcares, incluyendo, pero sin limitación, 2'-O-metilo, 2'-fluoro o 2'-metoxietoxi pueden aumentar la estabilidad termodinámica de una doble cadena formada, y al mismo tiempo proporcionar una mejor resistencia a las nucleasas.

15 [0061] Otros ejemplos de modificaciones adecuadas se describen en WO2007073149. La modificación de los oligonucleótidos donantes puede comprender, por ejemplo enlaces fosforotioato, sustituciones 2-OMe, el uso de LNA (locked nucleic acids), ribonucleótido y otras bases que modifican y preferiblemente mejoran, la estabilidad del híbrido entre el oligonucleótido y el aceptor, mediante la mejora de la afinidad de unión al ADN diana, o mediante la inhibición de la actividad nucleasa, o ambos.

20 [0062] Todos estos tipos de modificaciones son bien conocidos para el experto y están fácilmente disponibles de diversas fuentes comerciales.

25 [0063] En una realización, se proporciona un procedimiento según la invención en el que un nucleótido modificado se incorpora en el oligonucleótido, y en el que el nucleótido modificado tiene una mayor afinidad de unión en comparación con los nucleótidos A, C, T o G naturales con su nucleótido complementario, y en el que el nucleótido modificado se une más fuerte a un nucleótido en la posición opuesta en la primera secuencia de ADN en comparación con un nucleótido natural complementario al nucleótido en la posición opuesta en la primera secuencia de ADN y/o en el que el nucleótido modificado es un nucleótido resistente a la nucleasa.

30 [0064] Preferiblemente, la modificación es una modificación de bases, una modificación de bases en el extremo 3' y/o 5', una modificación del esqueleto o una modificación de azúcares. Tal como se describió anteriormente, los oligonucleótidos donantes según la invención pueden contener modificaciones para mejorar las características de hibridación, de manera que el donante muestra un aumento de afinidad para la cadena de ADN diana, que puede hacer la intercalación del donante más fácil y/o aumenta la estabilidad termodinámica de la doble cadena formada (en comparación con el mismo oligonucleótido que no comprende dicha modificación, y bajo las mismas circunstancias experimentales). El oligonucleótido donante, independientemente o adicionalmente, puede modificarse para volverse más resistente a nucleasas, lo cual puede estabilizar la estructura de doble cadena.

40 [0065] En la técnica anterior, se han descrito una amplia variedad de nucleótidos modificados que tienen una mayor afinidad de unión en comparación con los nucleótidos A, C, T o G naturales con su nucleótido complementario, y en los que el nucleótido modificado se une más fuerte a un nucleótido en la posición opuesta en la primera secuencia de ADN en comparación con un nucleótido natural complementario al nucleótido en la posición opuesta en la primera secuencia de ADN y/o en el que el nucleótido modificado es un nucleótido resistente a la nucleasa (véase por ejemplo el documento WO 2007073154 y las diversas modificaciones descritas anteriormente).

45 [0066] En ciertas realizaciones, una modificación está en una posición un nucleótido de distancia al desapareamiento, preferiblemente 2, 3, 4, 5, 6 ó 7 nucleótidos de distancia del desapareamiento. En ciertas realizaciones, la modificación se encuentra en una posición en dirección 3' del desapareamiento. En ciertas realizaciones, la modificación se encuentra en una posición en dirección 5' del desapareamiento.

50 [0067] El dominio que contiene o está directamente adyacente al desapareamiento y las secciones que contienen el nucleótido o nucleótidos modificados pueden solaparse. Por lo tanto, en ciertas realizaciones, el dominio que contiene el desapareamiento o está directamente adyacente al desapareamiento se encuentra en una posición diferente en el oligonucleótido que la sección de la cual se considera la modificación. En ciertas realizaciones, el dominio incorpora una o más secciones. En ciertas realizaciones, las secciones pueden incorporar el dominio. En ciertas realizaciones, el dominio y las secciones pueden estar situados en la misma posición en el oligonucleótido y tener la misma longitud es decir, las secciones coinciden en longitud y posición. En ciertas realizaciones, puede haber más de una sección dentro de un dominio.

60 [0068] Para la presente invención, esto significa que la parte del oligonucleótido que contiene el desapareamiento que es para alterar la doble cadena de ADN puede estar situada en una posición diferente o desplazada de la parte del oligonucleótido que se modifica.

65 [0069] En una realización preferida, el nucleótido modificado se selecciona del grupo que consiste de LNA y/o nucleótidos que tiene enlaces/uniones fosforotioato.

[0070] En una realización preferida, el nucleótido modificado es un ácido nucleico bloqueado (Locked Nucleic Acid). El ácido nucleico bloqueado (LNA) es un análogo de ADN con propiedades interesantes para su uso en la terapia génica antisentido y es conocido por el experto.

5 [0071] Los LNA son análogos de nucleósidos y nucleótidos bicíclicos y tricíclicos y pueden incorporarse en oligonucleótidos. Las características básicas estructurales y funcionales de LNA y análogos relacionados están descritos en diversas publicaciones y patentes, incluyendo W099/14226, WO00/56748, WO00/66604, W098/39352, US6043060, y US 6268490.

10 [0072] Los nucleósidos de LNA están disponibles para todas las nucleobases comunes (T, C, G, A, U, por ejemplo, de Exiqon (www.exiqon.com)) y son capaces de formar pares de bases de acuerdo con las reglas de apareamiento de bases de Watson-Crick. Cuando se incorporan en un oligonucleótido de ADN, los LNA hacen que el emparejamiento con una cadena de nucleótidos complementaria sea más rápida y aumenta la estabilidad de la doble cadena resultante. En otras palabras, el LNA combina la capacidad de discriminar entre dianas correctas e incorrectas (alta especificidad) con una bioestabilidad muy alta (bajo recambio) y una afinidad sin precedentes (muy alta resistencia de unión a diana). De hecho, el aumento de afinidad registrado con LNA deja las afinidades de todos los análogos previamente descritos en el rango de bajo a modesta.

20 [0073] LNA es un análogo de ARN, en el que la ribosa está limitada estructuralmente por un puente 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 lugar a un aumento en la Tf (temperatura de fusión) de LNA que contiene dobles cadena, y por consiguiente, mayores afinidades de unión y especificidades superiores. Es importante destacar que las características favorables de LNA no vienen a expensas de otras propiedades importantes como a menudo observado con análogos de ácidos nucleicos.

25 [0074] El LNA puede mezclarse libremente con todas las otras químicas que componen el universo de análogos de ADN. Las bases de LNA pueden incorporarse en oligonucleótidos como secuencias de todo LNA cortas o como quimeras de ADN/LNA más largas. El LNA se puede colocar en posiciones internas 3' o 5'. Sin embargo, debido a sus conformaciones bicíclicas rígidas, los residuos de LNA a veces alteran el giro helicoidal de cadenas de ácido nucleico. Por lo tanto, en general, se prefiere menos diseñar un oligonucleótido con dos o más residuos adyacentes de LNA. Preferiblemente, los residuos de LNA están separados por al menos un nucleótido (modificado) que no altera el giro helicoidal, tal como un nucleótido convencional (A, C, T o G).

35 [0075] El monómero de LNA originalmente desarrollado y preferido (el monómero [beta]-D-oxi-LNA) se ha modificado en nuevos monómeros de LNA. Se ha sugerido que el nuevo [alfa]-L-oxi-LNA muestra una estabilidad superior frente a actividad 3'-exonucleasa, y también es más potente y más versátil que [beta]-D-oxi-LNA en el diseño de oligonucleótidos antisentido potentes. También se pueden utilizar xilo-LNA, L-ribo LNA y otros LNA, tal como se describe en los documentos W09914226, WO00/56748, WO00/66604 y J. Org. Chem., 2010, 75 (7), pág. 2341-2349. En la presente invención, cualquier LNA de los tipos anteriores es eficaz para conseguir los objetivos de la invención, es decir, la mejora de la eficacia de TNE, con una preferencia por análogos de [beta]-D-LNA.

40 [0076] Tal como se mencionó anteriormente, preferiblemente, un LNA está al menos un nucleótido de distancia de un desapareamiento en el oligonucleótido utilizado en el procedimiento según la invención. Aunque en la técnica en TNE, la modificación de LNA ha sido incluida entre una lista de posibles modificaciones de oligonucleótidos como alternativas para las moléculas quiméricas utilizadas en TNE, se ha encontrado que cuando se modifican oligonucleótidos de ADN de cadena única, tal como se utiliza en el procedimiento según la invención, para contener LNA, la eficacia de TNE aumenta significativamente en la medida en que en la actualidad se ha encontrado cuando el LNA se encuentra al menos un nucleótido de distancia del desapareamiento, incluso más preferiblemente un nucleótido del desapareamiento. El oligonucleótido preferiblemente no contiene más de aproximadamente 75% (redondeado al número entero más cercano de nucleótidos) de LNA.

45 [0077] En otra realización preferida, el nucleótido modificado comprende un nucleótido que tiene un enlace fosforotioato. Muchas de las modificaciones de nucleótidos disponibles comercialmente se han desarrollado para su uso en aplicaciones antisentido para la terapia génica. La química resistente a nucleasa más simple y más utilizada para aplicaciones antisentido (los oligonucleótidos antisentido de "primera generación") es el enlace fosforotioato (PS). En estas moléculas, un átomo de azufre sustituye a un oxígeno sin puente en el esqueleto fosfato del oligonucleótido (véase, por ejemplo, la figura 2 de WO2007073154, que da lugar a actividad de resistencia a endonucleasa y exonucleasa.)

60 [0078] Los enlaces fosforotioato se pueden incorporar, sin embargo, en cualquier posición deseada en el oligonucleótido.

65 [0079] Preferiblemente, el nucleótido modificado es un LNA o, incluso más preferiblemente un nucleótido que tiene un enlace fosforotioato, más preferiblemente el oligonucleótido modificado que tiene al menos uno, por ejemplo, uno, dos, tres o cuatro, fosforotioatos. Preferiblemente, el oligonucleótido contiene al menos un fosforotioato en o cerca de (por ejemplo, dentro de 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 nucleótidos) del extremo 5' del oligonucleótido según la invención.

5 **[0080]** En una realización, se proporciona que el oligonucleótido utilizado en el procedimiento según la invención comprende al menos dos, tres, cuatro, o cinco nucleótidos modificados. Preferiblemente, el oligonucleótido comprende dos, tres, cuatro o cinco nucleótidos modificados. Preferiblemente, las modificaciones se seleccionan del grupo que consiste de LNA y/o enlaces fosforotioato.

10 **[0081]** En ciertas realizaciones preferidas de la invención, puede modificarse el nucleótido en el oligonucleótido en la posición del desapareamiento. Si se puede modificar o no el desapareamiento dependerá en gran medida en el mecanismo exacto del intercambio dirigido de nucleótidos o del mecanismo de reparación del ADN de la célula utilizando la diferencia en la afinidad entre las cadenas donante y aceptora. En una realización preferida, el nucleótido en la posición del desapareamiento no es un nucleótido modificado.

15 **[0082]** En una realización, se proporciona un procedimiento según la invención en el que el nucleótido modificado es al menos un nucleótido de dicho al menos un desapareamiento situado como máximo 2, preferiblemente como máximo 1 nucleótido del extremo 3' de dicho oligonucleótido, lo más preferiblemente dicho al menos un desapareamiento se encuentra en el extremo 3' del oligonucleótido.

20 **[0083]** Como se ha descrito previamente, se ha encontrado que cuando oligonucleótidos de ADN de cadena única, tal como se utiliza en el procedimiento según la invención, se modifican para contener nucleótidos modificados, por ejemplo LNA, la eficacia de TNE aumenta significativamente en la medida en que se ha encontrado en la actualidad cuando el nucleótido modificado, preferiblemente LNA, se encuentra al menos un nucleótido de distancia del desapareamiento, incluso más preferiblemente un desapareamiento del desapareamiento. En otras palabras, en una realización preferida, un nucleótido modificado, preferiblemente un LNA, está separado del desapareamiento en al menos otro nucleótido, cuyo al menos otro nucleótido no es un LNA, preferiblemente no es un nucleótido modificado. Sin embargo, en caso de
25 por ejemplo un enlace fosforotioato, dicho enlace puede estar directamente adyacente al desapareamiento de nucleótidos.

30 **[0084]** En una realización, se proporciona un procedimiento en el que la alteración del ADN de doble cadena aceptor está dentro de una célula, preferiblemente seleccionada del grupo que consiste en una célula procariota, una célula bacteriana, una célula eucariota, una célula vegetal, una célula animal, una célula de levadura, una célula fúngica, una célula de roedores, una célula humana, una célula no humana, y/o una célula embrionaria (no humana). La invención es, en su forma más amplia, genéricamente aplicable a todo tipo de organismos, tales como seres humanos, animales, plantas, peces, reptiles, insectos, hongos, bacterias y así sucesivamente. La invención, por lo tanto, se puede realizar dentro de una célula seleccionada del grupo que consiste en una célula procariota, una célula bacteriana, una célula eucariota, una célula vegetal, una célula animal, una célula de levadura, una célula fúngica, una célula de roedores, una
35 célula humana, una célula no humana, y/o una célula embrionaria no humana. En una realización preferida, la célula es una célula vegetal.

40 **[0085]** También se proporciona un procedimiento tal como se describe en el presente documento, en el que el ADN aceptor de doble cadena se obtiene de un organismo procariota, bacteria, un organismo eucariota, una planta, un animal, una levadura, un hongo, un roedor, o un ser humano. En una realización preferida se obtiene el ADN aceptor de doble cadena de una planta (o es ADN de la planta presente en una célula vegetal).

45 **[0086]** En una realización de la invención, la alteración de la secuencia de ADN de doble cadena aceptor es una delección, una sustitución y/o una inserción de al menos un nucleótido. Preferiblemente, la alteración de la secuencia de ADN de doble cadena es una delección, una sustitución y/o una inserción de no más de 5 nucleótidos, preferiblemente no más de 4, 3, 2, 1 nucleótidos, lo más preferiblemente un nucleótido. Más preferiblemente, la alteración de la secuencia de ADN de doble cadena aceptor es una sustitución de no más de 5 nucleótidos, preferiblemente no más de 4, 3, 2, 1
50 nucleótidos, lo más preferiblemente un nucleótido.

55 **[0087]** En otra realización, se proporciona un procedimiento según la invención, en el que el ADN aceptor de doble cadena es de ADN genómico, ADN lineal, cromosomas artificiales, cromosomas artificiales de mamíferos, cromosomas artificiales bacterianos, cromosomas artificiales de levadura, cromosomas artificiales de plantas, ADN cromosómico nuclear, ADN de orgánulos, y/o ADN episomal incluyendo plásmidos.

60 **[0088]** De hecho, la invención es aplicable para la modificación de cualquier tipo de ADN, tales como los descritos anteriormente. La invención puede realizarse in vivo así como ex vivo o in vitro, por ejemplo sometiendo el ADN a modificar con el oligonucleótido donante en presencia de proteínas que son capaces de un intercambio dirigido de nucleótidos, por ejemplo, y, en particular, proteínas que son funcionales en el mecanismo de reparación de desapareamientos de la célula.

65 **[0089]** La liberación del oligonucleótido a una célula se puede lograr a través de electroporación u otras técnicas convencionales que son capaces de liberar al núcleo o al citoplasma. En pruebas in vitro del procedimiento de la presente invención se puede lograr utilizando el sistema libre de células tal como se describe, entre otros, en el documento WO01/87914, WO03/027265, WO99/58702, WO01/92512. El oligonucleótido puede comprender nucleótidos metilados, nucleótidos no metilados o ambos.

5 [0090] La invención es, en su forma más amplia, aplicable para muchos propósitos para alterar una célula, para corregir una mutación mediante la restauración al tipo salvaje, para inducir una mutación, para inactivar una enzima mediante la alteración de la región codificante, para modificar la bioactividad de una enzima mediante la alteración de la región codificante, para modificar una proteína mediante la alteración de la región codificante.

10 [0091] La invención también se refiere al uso de oligonucleótidos esencialmente tal como se describe anteriormente, para alterar una célula, corregir una mutación mediante la restauración al tipo salvaje, para inducir una mutación, para inactivar una enzima mediante la alteración de la región codificante, para modificar la bioactividad de una enzima mediante la alteración de la región codificante, para modificar una proteína mediante la alteración de la región codificante, reparación de desapareamientos, alteración dirigida de material genético (planta), incluyendo mutación de genes, reparación dirigida de genes y knockout de genes. Preferiblemente, el procedimiento según la invención es para la alteración dirigida de ADN aceptor de doble cadena obtenido de una planta, presente en una planta, o para estar presente en una planta.

15 [0092] La descripción se refiere además a kits, que comprenden uno o más oligonucleótidos tal como se definen en otros puntos en el presente documento, opcionalmente en combinación con proteínas que son capaces de TNE.

20 [0093] En particular, el kit comprende instrucciones para la alteración dirigida de un ADN de doble cadena. Las instrucciones comprenden esencialmente una descripción de las etapas del procedimiento según la invención descrita en el presente documento.

25 [0094] En particular, se describe un kit que comprende instrucciones para realizar un procedimiento para la alteración dirigida de un ADN aceptor de doble cadena según la invención descrita en el presente documento, en el que el kit comprende además un oligonucleótido para utilizar en el procedimiento según la invención. Preferiblemente, el oligonucleótido es un oligonucleótido tal como se describe aquí.

30 [0095] Para esto, el kit puede comprender por lo tanto un oligonucleótido que comprende al menos un dominio que es capaz de hibridarse con la primera secuencia de ADN, cuyo dominio comprende, o está directamente adyacente a al menos un desapareamiento con respecto a una secuencia de ADN diana, y en el que dicho al menos un desapareamiento se encuentra como máximo 2, preferiblemente como máximo 1 nucleótido del extremo 3' de dicho oligonucleótido, lo más preferiblemente dicho al menos un desapareamiento está en el extremo 3' del oligonucleótido, y además comprende instrucciones para llevar a cabo el procedimiento según la invención, es decir, para realizar el TNE en el que se utiliza un oligonucleótido que tiene un desapareamiento en relación con el ADN diana y en el que el desapareamiento se encuentra como máximo 2, preferiblemente como máximo 1 nucleótido del extremo 3' de dicho oligonucleótido, lo más preferiblemente dicho al menos un desapareamiento está en el extremo 3' del oligonucleótido.

35 [0096] Como se entenderá por el experto en la materia, a través de instrucciones que, al menos, informan de que el desapareamiento anterior se encuentra en el extremo 3' del oligonucleótido o 1 nucleótido del extremo 3' o 2 nucleótidos del extremo 3', y que el oligonucleótido se puede utilizar para la alteración de una secuencia de ADN de doble cadena, comprendiendo dicho kit estas instrucciones y el oligonucleótido son un kit dentro del alcance de los kits descritos anteriormente y divulgados.

40 [0097] El kit puede, por ejemplo, también tomar la forma de un sitio web o un documento que proporciona instrucciones o información para realizar la alteración dirigida de un ADN aceptor de doble cadena según el procedimiento de la invención, tal como se ha descrito y se describe en el presente documento, y el suministro (por separado) u ofrecimiento de un oligonucleótido adecuados para utilizar en el procedimiento según la invención, y tal como se ha descrito y se describe en el presente documento.

45 [0098] En una realización preferida, se proporciona un kit según la descripción, tal como se describe anteriormente, en el que el oligonucleótido es un oligonucleótido que, cuando se combina con una secuencia de ADN aceptor de doble cadena que contiene una primera secuencia de ADN y una segunda secuencia de ADN que es el complemento de la primera secuencia de ADN, comprende un dominio que es capaz de hibridarse a la primera secuencia de ADN, cuyo dominio comprende, o está directamente adyacente a, al menos un desapareamiento con respecto a la primera secuencia de ADN, y en el que dicho al menos un desapareamiento se encuentra como máximo 2, preferiblemente como máximo el 1 de nucleótidos del extremo 3' de dicho oligonucleótido, lo más preferiblemente dicho al menos un desapareamiento se encuentra en el extremo 3' del oligonucleótido.

50 **Ejemplos:**

60 Ejemplo 1: TNE en un episoma de GFP en protoplastos de tabaco

[0099] El TNE implica la introducción de oligonucleótidos en las células donde inducen una mutación en el locus diana genómico, impulsado por un nucleótido de desapareamiento en el oligonucleótido.

65

[0100] En los experimentos siguientes se determinó la precisión y eficacia de TNE realizando TNE en un episoma (plásmido) que lleva una proteína verde fluorescente (GFP) no funcional que contiene un codón de parada en marco. La cotransfección de este plásmido junto un oligonucleótido diseñado para reparar el codón de parada debería restaurar la expresión y actividad de GFP, que se anotó, en los experimentos siguientes, en un único nivel de células 24 horas después de la transfección de protoplastos. Este primer ejemplo describe experimentos realizados en protoplastos de tabaco.

Materiales y procedimientos

Construcciones

[0101] Se sintetizó el marco de lectura abierto del GFP funcional y se optimizó el uso de codones para su uso en el *Solanaceae*. Se produjo una variante de GFP con un cambio de nucleótido en la posición 82 (G a T) tal como se muestra en la figura 1. Esto dio lugar a la producción de un codón de parada en marco y la secuencia de aminoácidos de la proteína resultante se muestra en la figura 2. El ORF de GFP (GFP WT) y la variante de GFP con el codón de parada (GFP-STOP) se clonaron como fragmentos XhoI-SacI en el sitio de clonación múltiple de un vector de base pUC que contiene el promotor CaMV 35S para la expresión génica en células vegetales. Esto dio lugar a las construcciones pKG7381 (GFP-WT) y pKG7384 (GFP-STOP). Además, la GFP se fusiona traduccionalmente a una etiqueta de 6x His y una NLS (señal de localización nuclear de secuencia) para facilitar la acumulación de la proteína GFP en el núcleo del protoplasto y así mejorar nuestra capacidad para anotar las células positivas para GFP. Estas construcciones se muestran en la figura 3.

Oligonucleótidos

[0102] Los oligonucleótidos para reparar el codón de parada en el gen de GFP se muestran en la tabla 1.

Tabla 1. Oligonucleótidos utilizados en este estudio. Se subraya el nucleótido de desapareamiento en cada oligonucleótido. Los asteriscos representan enlaces fosforotioato (PS). La orientación del oligonucleótido se da como sentido (idéntica a la secuencia de codificación de GFP) o antisentido (complementaria a la secuencia de codificación de GFP). Todos los oligonucleótidos se muestran en la orientación 5'-3'. PB221 contiene una modificación de LNA (L = LNA C) además del desapareamiento.

Oligo	Secuencia	Orientación
GFP7	T*G*A*A*CAGCTCCTCGCCCTTGC*T*C*A*C (SEQ ID NO:5)	Antisentido
GFP8	T*G*A*A*CAGCTCCTAGCCCTTGC*T*C*A*C (SEQ ID NO:6)	Antisentido
PB154	G*C*A*C*CAACCCGGTGAACAGCT*C*T*C (SEQ ID NO:7)	Antisentido
GFP3	G*T*G*A*GCAAGGGCGAGGAGCTG*T*T*C*A (SEQ ID NO:8)	Sentido
PB153	C*G*C*C*CTTGCTCACCATCTCGA*G*A*A*C (SEQ ID NO:9)	Antisentido
PB218	C*A*C*C*ACCCCGGTGAACAGCTC*T*C*A (SEQ ID NO:10)	Antisentido
PB219	A*C*C*A*CCCCGGTGAACAGCTCC*T*C*A*G (SEQ ID NO:11)	Antisentido
PB220	C*C*A*C*CCCGGTGAACAGCTCCT*C*A*G*C (SEQ ID NO:12)	Antisentido
PB221	G*C*A*C*CAACCCGGTGAACAGCT*C*L*T*C (SEQ ID NO:13)	Antisentido

Aislamiento y transfección de protoplastos de tabaco

[0103] El material de partida para este ejemplo eran cultivos de brotes de tabaco *in vitro*, cultivados asépticamente en frascos de vidrio (750 ml) en medio MS20 a una temperatura de 25/20°C (día/noche) y una densidad de flujo de fotones de 80 $\mu\text{E}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ (fotoperiodo de 16/24 h). El medio MS20 es medio de Murashige y Skoog básico (Murashige, T. y Skoog, F., *Physiologia Plantarum*, 15: 473-497, 1962) que contiene 2% (p/v) de sacarosa, sin adición de hormonas y 0,8% de agar Difco. Los brotes se subcultivaron cada 3 semanas a un medio fresco.

[0104] Para el aislamiento de protoplastos de mesófilo, se recogieron hojas totalmente expandidas de cultivos de brotes de 3-6 semanas. Las hojas se cortan en tiras delgadas de 1 mm, que se transfirieron a continuación a placas de Petri grandes (100 mm x 100 mm) que contenían 45 ml de medio basal MDE para un tratamiento de preplasmolisis de 30 min a temperatura ambiente. El medio basal MDE contenía 0,25 g de KCl, 1,0 g $\text{MgSO}_4\cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0,136 g de KH_2PO_4 , 2,5 g de polivinilpirrolidona (PM 10.000), 6 mg de ácido naftalenacético y 2 mg 6-bencilaminopurina en un volumen total de 900 ml. La osmolaridad de la solución se ajustó a 600 mOsm $\cdot\text{kg}^{-1}$ con sorbitol, el pH a 5,7.

[0105] Después de la preplasmolisis, se añadieron 5 ml de solución madre de enzima a cada placa de Petri. La solución madre de enzima consistía en 750 mg Celulasa Onozuka R10, 500 mg de driselasa y 250 mg de macerozima R10 por 100 ml (Duchefa B.V., Haarlem, Países Bajos, por ejemplo, productos C8001 y M8002), se filtró sobre papel Whatman y se esterilizaron por filtro. Las placas de Petri se sellaron y se incubaron durante la noche en la oscuridad a 25°C sin movimiento para digerir las paredes celulares.

[0106] La suspensión de protoplastos se pasó a continuación a través de tamices de 500 μm y 100 μm en matraces Erlenmeyer de 250 ml, se mezcló con un volumen igual de medio de lavado de KCl, y se centrifugó en tubos de 50 ml a 85 xg durante 10 min. El medio de lavado de KCl consistía en 2,0 g de $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ por litro y una cantidad suficiente de KCl para llevar la osmolaridad a 540 mOsm.kg⁻¹.

[0107] La etapa de centrifugación se repitió dos veces, primero con los protoplastos resuspendidos en medio de lavado MLm, que son los macronutrientes del medio MS (Murashige, T. y Skoog, F., *Physiologia Plantarum*, 15: 473-497, 1962) a la mitad de la concentración normal, 2,2 g de $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ por litro y una cantidad de manitol para llevar la osmolaridad a 540 mOsm.kg⁻¹, y finalmente con los protoplastos resuspendidos en medio ML, que es medio MLm con manitol sustituido por sacarosa .

[0108] Los protoplastos fueron recuperados de la banda de flotación en medio sacarosa y se resuspendieron en un volumen igual de medio de lavado de KCl. Sus densidades se contaron usando un hemocitómetro. Posteriormente, los protoplastos se centrifugaron de nuevo en tubos de vidrio de 10 ml a 85 xg durante 5 min y los sedimentos se resuspendieron a una densidad de 1×10^5 protoplastos ml⁻¹ en medio de electroporación.

Electroporación de protoplastos

[0109] Se utilizó un aparato BioRad Gene Pulser para la electroporación. Se utilizó PHBS como medio de electroporación (10 mM Hepes, pH 7,2; 0,2 M manitol, 150 mM NaCl; 5 mM CaCl_2) y con una densidad de protoplastos en la mezcla de electroporación de aproximadamente 1×10^6 por ml, los parámetros de electroporación fueron 250V (625 V cm⁻¹) de carga y 800 μF de capacitancia con un tiempo de recuperación entre el pulso y el cultivo de 10 minutos. Para cada electroporación se utilizaron aproximadamente 2 μg de oligonucleótido total y 20 μg de KG7381 o KG7384 por 800 microlitros de electroporación.

[0110] Después del tratamiento de electroporación, los protoplastos se colocaron en hielo durante 30 min para recuperación, a continuación se resuspendieron en medio de cultivo T₀ a una densidad de 1×10^5 protoplastos ml⁻¹ y se incubaron a 21°C durante la noche en la oscuridad. El medio de cultivo T₀ contenía (por litro, pH 5,7) 950 mg KNO₃, 825 mg NH₄NO₃, 220 mg $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 185 mg MgSO₄·7H₂O, 85 mg KH₂PO₄, 27,85 mg FeSO₄·7H₂O, 37,25 mg Na₂EDTA·2H₂O, los micronutrientes según el medio de Heller (Heller, R., *Ann Sci Nat Bot Biol Veg* 14: 1-223, 1953), vitaminas según el medio de Morel y Wetmore (Morel, G. y RH Wetmore, *Amer. J. Bot.* 38: 138-40, 1951), 2% (p/v) de sacarosa, 3 mg de ácido naftalenacético, 1 mg de 6-bencilaminopurina y una cantidad de manitol para llevar la osmolaridad de 540 mOsm.kg⁻¹. Los protoplastos se examinaron bajo el microscopio UV 20 horas después de la electroporación para visualizar la señal de GFP en el núcleo.

[0111] Alternativamente, el tratamiento con PEG podría ser utilizado para introducir el ADN plásmido y de oligonucleótido en protoplastos de tabaco. Los procedimientos para lograr esto son bien conocidos en la literatura.

Resultados

[0112] Cuando la construcción KG7381 (GFP-WT) se sometió a electroporación a protoplastos de tabaco se observó una señal de GFP fuerte situada en el núcleo después de aproximadamente 20 horas de incubación. Esta señal es debida a la fuerte expresión transitoria del ORF de GFP. Esta señal desapareció en 48 horas, presumiblemente debido a la degradación/eliminación del ADN plasmídico de la célula. En un experimento típico, aproximadamente el 30% de los protoplastos mostraron una señal de GFP y esto representa la eficacia de electroporación máxima. No se observó ninguna señal de GFP cuando se introdujo KG7384 (GFP-STOP) en protoplastos de tabaco.

[0113] Una vez que la configuración experimental se hubo validado, se llevaron a cabo experimentos mediante los cuales se introdujo KG7384 en protoplastos de tabaco en combinación con varios diseños diferentes de oligonucleótidos con posición alternativa del nucleótido de desapareamiento.

[0114] Cuando se reintrodujo KG7384 con oligonucleótidos que portaban un desapareamiento para reparar el codón de parada introducido se observó de hecho la expresión de GFP restaurada. La expresión de GFP no se observó cuando KG7384 se introdujo conjuntamente con un oligonucleótido que carecía de un desapareamiento. Se concluyó que la maquinaria celular de TNE es capaz de usar el oligonucleótido para alterar la secuencia de GFP-STOP, restaurando así la actividad de GFP en las células.

[0115] La eficacia de la reparación de cada oligonucleótido analizado se muestra en la figura 4. En cada experimento independiente se utilizó KG7381 para determinar la máxima eficacia de transformación y esto se utilizó a continuación para corregir las eficacias de reparación de cada uno de los oligonucleótidos. Por ejemplo, si el número de eventos de reparación de GFP con un oligonucleótido era igual al número de células GFP positivas después de la transfección de KG7384, entonces el porcentaje de la reparación GFP sería del 100%.

[0116] A partir de los datos se concluye que la reparación sólo se produce cuando un nucleótido de desapareamiento está presente en el oligonucleótido, ya que no se observó ninguna reparación cuando se utilizó GFP8. La reparación se observó en aproximadamente el 30% de las células transformadas cuando el oligonucleótido contenía un único

desapareamiento en el centro (GFP7). Inesperadamente, se encontró que la eficacia de TNE mejoró cuando el desapareamiento se encontraba en el extremo 3' del oligonucleótido (PB154). En este caso, la eficacia de reparación era la más alta observada en los experimentos actuales. Sorprendentemente, un oligonucleótido con desapareamiento en el extremo 5' (PB153) produjo una eficacia de reparación muy baja. GFP3 era casi tan eficaz como GFP7, PB218 y PB221.

[0117] A continuación, se diseñaron y probaron una serie de oligonucleótidos (PB218, PB219, PB220) con el desapareamiento en la posición -1, -2 o -3, respectivamente, en comparación con el extremo 3' del oligonucleótido. Cuando el desapareamiento se encontraba en la posición -3, la eficacia de reparación cayó por debajo de la de GFP7. PB218 (posición -1) fue tan eficiente como GFP7. PB219 (posición -2) produjo una eficacia de reparación equivalente a PB154. Por lo tanto, aunque un desapareamiento en el extremo 3' produce una eficacia de reparación elevada máxima, el posicionamiento del desapareamiento en posiciones internas -1, -2 puede producir un TNE eficaz también.

[0118] A continuación, se probó un oligonucleótido (PB221) con una modificación LNA en la posición -2 junto con un desapareamiento en 3'. Los nucleótidos de LNA aumentan la afinidad de un oligonucleótido por su diana. Los resultados se muestran en la figura 5.

Ejemplo 2. TNE en un episoma de YFP en protoplastos de tomate

[0119] El ejemplo 1 demostró que un oligonucleótido con un desapareamiento en el extremo 3' es eficaz en la realización de TNE. Con el fin de mostrar el amplio alcance de la utilización del procedimiento de acuerdo con la invención y para excluir que el aumento de la eficacia de TNE observada con el oligonucleótido 3' se deba a la secuencia específica del oligonucleótido utilizado en el ejemplo 1 es importante demostrar que oligonucleótidos con una secuencia alternativa, pero también con desapareamiento situado según la invención, por ejemplo, un desapareamiento 3', son activos en un ensayo de TNE. Además, es valioso demostrar que el efecto observado se produce también en otras especies de plantas y por lo tanto se decidió realizar experimentos similares en protoplastos de tomate.

Construcciones

[0120] Se generaron las versiones de YFP-WT y YFP-STOP, con un cambio de nucleótido situado en la posición 186 (C a T) dando como resultado un codón de parada. Se muestran tanto la secuencia de nucleótidos del gen de YFP-STOP (figura 5) como la secuencia de proteína traducida (figura 6). Aunque los genes de GFP y YFP comparten una homología de secuencia significativa este codón de parada se diseñó en una posición diferente en la secuencia de codificación de manera que los oligonucleótidos tendrían una secuencia completamente diferente a los utilizados en los experimentos de GFP. Estos genes se clonaron a continuación en un vector de expresión de la planta de manera que los ORF de YFP se expresaron por el promotor 35S viral. Se diseñó un oligonucleótido con un desapareamiento en su extremo 3' para convertir la T en la posición 186 en la construcción YFP-STOP a una C y por lo tanto restaurar la actividad YFP.

[0121] A continuación se muestra la secuencia de los oligonucleótidos utilizados para reparar el codón de parada en YFP (PB212). Los enlaces fosforotioato están representados por asteriscos. El desapareamiento en el oligonucleótido está subrayado.

PB212 G*A*T*G*AACTTGAGAGTAAGCTT*T*C*C*G (SEQ ID NO: 14)

Aislamiento y purificación de protoplastos de tomate

[0122] El aislamiento y la regeneración de protoplastos de hoja de tomate se ha descrito previamente (Shahin, 1985; Tan et al, 1987a; Tan et al, 1987b) y las soluciones requeridas se pueden encontrar en estas publicaciones. Brevemente, se esterilizaron semillas de *Solanum lycopersicum* con hipoclorito al 0,1% desarrolladas in vitro en medio MS20 estéril en un fotoperíodo de 16/8 horas a 2000 lux a 25°C y humedad relativa de 50-70%. Se colocó 1 g de hojas recién recogidas en un plato con 5ml de CPW9M y, usando una hoja de bisturí, se cortaron perpendicular al tallo principal cada mm. Se transfirieron a un plato nuevo de 25 ml de solución de enzima (CPW9M que contiene 2% de celulosa Onozuka RS, 0,4% de macerozima Onozuka R10, 2,4-D (2 mg/ml), NAA (2 mg/ml), BAP (2 mg/ml) pH 5,8) y la digestión procedió durante la noche a 25°C en la oscuridad. Los protoplastos se liberaron a continuación colocándolos en un agitador orbital (40-50 rpm) durante 1 hora. Los protoplastos se separaron de los desechos celulares mediante el paso a través de un tamiz de 50 µm, y lavando el tamiz con 2x CPW9M. Los protoplastos se centrifugaron a 85 g, se desechó el sobrenadante, y a continuación se recogió en la mitad del volumen de CPW9M. Los protoplastos se capturaron finalmente en 3 ml de CPW9M y a continuación se añadieron 3 ml de CPW18S cuidadosamente para evitar la mezcla de las dos soluciones. Los protoplastos se centrifugaron a 85 g durante 10 minutos y los protoplastos viables que flotaban en la capa de interfase se recogieron usando una pipeta pasteur larga. El volumen de protoplastos se aumentó a 10 ml mediante la adición de CPW9M y el número de protoplastos recuperados se determinó en un hemocitómetro. La suspensión de protoplastos se centrifugó a 85x g durante 10 minutos a 5°C. El sobrenadante se desechó y el sedimento de protoplastos se resuspendió a una concentración final de 10⁶ mL⁻¹ en medio de lavado CPW9M. En un tubo de 10 ml, se mezclan suavemente pero completamente 250 µl de suspensión de protoplastos +/- 12,5 µg de dsRNA y 250 µl de solución de PEG (40% PEG4000 (Fluka # 81240), Ca(NO₃)₂ 0,1 M, manitol 0,4 M). Después de 20 min de incubación a temperatura ambiente se añaden gota a gota 5 ml de Ca(NO₃)₂ 0,275 M frío. La suspensión de protoplastos se

centrifuga durante 10 min a 85x g a 4°C y desecha el sobrenadante se. Los protoplastos de tomate se transfirieron a continuación a placas de Petri de 4 cm que contenían 4 ml de medio de cultivo K8P y se examinaron después de 24 horas para la expresión YFP utilizando un microscopio de fluorescencia.

5 Resultados

[0123] Los resultados de estos experimentos se muestran en la figura 7. Se pudo confirmar que un oligonucleótido de una secuencia diferente con un desapareamiento en el extremo 3' era realmente capaz de restaurar la expresión de YFP en protoplastos de tomate.

10

Ejemplo 3. Efectos del enlace PS en la eficacia de TNE

[0124] Este ejemplo muestra que no se requiere que el oligonucleótido según la invención incorpore nucleótidos que tienen enlaces fosforotioato ni es necesario que el oligonucleótido según la invención incorpore cualquier otro tipo de modificación.

15

Procedimientos

[0125] Se aislaron protoplastos de mesófilo de tomate de hojas jóvenes de tomate en plantas in vitro. Se transfectaron construcciones reporteros que albergaban un gen eYFP(parada), cuya expresión estaba dirigida por el promotor CaMV 35S, y oligonucleótidos en protoplastos de tomate mediante un procedimiento mediado por PEG. Después de la incubación durante la noche bajo oscuridad a 30°C en una cámara de crecimiento, se observaron protoplastos infectados utilizando un microscopio de fluorescencia equipado con un conjunto de filtros YFP. Se anotó el número de protoplastos que emiten fluorescencia de color amarillo se obtuvo y se calculó la eficacia de TNE dividiendo el número de protoplastos de color amarillo por el número de protoplastos transfectados.

20

25

[0126] Secuencia de los oligonucleótidos probados:
 PB72 C*A*T*G*CATGCATGCATGCATGC*A*T*G*C
 (SEQ ID NO:15) 25 mer, PS, Sin sentido (=control)
 PB243 G*A*T*G*AACTTAAGTGTAAAGTTT*A*C*C*G
 (SEQ ID NO:16) 25 mer, PS, 3' MM (=desapareamiento) Antisentido
 TF8 GATGAACCTTAAGTGTAAAGTTTACCG
 (SEQ ID NO:17) 25 mer, 3' MM Antisentido
 * representa un enlace fosforotioato

35

[0127] La reacción de TNE causada por PB243, y TF8 convierte la secuencia diana de TAA a TAC. Los oligonucleótidos PB243 y TF8 fueron así diseñados para reparar el codón de parada (STOP) en YFP, donde PB72 comprende enlaces PS, y TF8 no comprende enlaces PS. Tal como se muestra en la figura 8, PB243 fue capaz de restaurar la expresión de YFP con una eficacia del 20,13%, mientras que TF8 fue capaz de restaurar la expresión de YFP con una eficacia del 5,83%, por tanto considerablemente más elevada (casi 15 veces y casi 4 veces respectivamente) en comparación con el nivel base de 1,43 del oligonucleótido sin sentido.

40

[0128] Este ejemplo muestra por tanto que el uso de oligonucleótidos, con o sin modificación, al igual que los enlaces de PS, se puede utilizar en TNE.

45

Literatura

[0129]

Alexeev, V. and Yoon, K. (1998). Stable and inheritable changes in genotype and phenotype of albino melanocytes induced by an RNA-DNA oligonucleotide. *Nat Biotechnol* 16, 1343-6.
 Beetham, P. R., Kipp, P. B., Sawycky, X. L., Arntzen, C. J. and May, G. D. (1999). A tool for functional plant genomics: chimeric RNA/DNA oligonucleotides cause in vivo gene-specific mutations. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96, 8774-8.
 Dong, C., Beetham, P., Vincent, K. and Sharp, P. (2006). Oligonucleotide-directed gene repair in wheat using a transient plasmid gene repair assay system. *Plant Cell Rep* 25, 457-65.
 Igoucheva, O., Alexeev, V. and Yoon, K. (2001). Targeted gene correction by small single-stranded oligonucleotides in mammalian cells. *Gene Ther* 8, 391-9.
 Kmiec, E. B. (2003). Targeted gene repair -- in the arena. *J Clin Invest* 112, 632-6.
 Kochevenko, A and Willmitzer, L. (2003). Chimeric RNA/DNA oligonucleotide-based site-specific modification of the tobacco acetolactate synthase gene. *Plant Physiol* 132, 174-84.
 Liu, L., Cheng, S., van Brabant, A. J. and Kmiec, E. B. (2002). Rad51p and Rad54p, but not Rad52p, elevate gene repair in *Saccharomyces cerevisiae* directed by modified single-stranded oligonucleotide vectors. *Nucleic Acids Res* 30, 2742-50.
 Okuzaki, A. and Toriyama, K. (2004). Chimeric RNA/DNA oligonucleotide-directed gene targeting in rice. *Plant Cell Rep* 22, 509-12.

62

Parekh-Olmedo, H., Ferrara, L., Brachman, E. and Kmiec, E. B. (2005). Gene therapy progress and prospects: targeted gene repair. *Gene Ther* 12, 639-46.

Rice, M. C., Czymmek, K. and Kmiec, E. B. (2001). The potential of nucleic acid repair in functional genomics. *Nat Biotechnol* 19, 321-6.

5 Ruiters, R., van den Brande, I., Stals, E., Delaure, S., Cornelissen, M. and D'Halluin, K. (2003). Spontaneous mutation frequency in plants obscures the effect of chimeroplasty. *Plant Mol Biol* 53, 675-89.

Shahin, E. A. (1985). Totipotency of tomato protoplasts. *Theor. Appl. Genet.* 69, 235 -240.

Tan, M.-L. M. C., Colijn-Hooymans, C. M., Lindhout, W. H. and Kool, A. J. (1987a). A comparison of shoot regeneration from protoplasts and leaf discs of different genotypes of the cultivated tomato. *Theor. Appl. Genet.* 75, 105 - 108.

10 Tan, M.-L. M. C., Rietveld, E. M., van Marrewijk, G. A. M. and Kool, A. J. (1987b). Regeneration of leaf mesophyll protoplasts of tomato cultivars (*L. esculentum*): factors important for efficient protoplast culture and regeneration. *Plant Cell Reports* 6, 172 - 175.

Zhu, T., Mettenberg, K., Peterson, D. J., Tagliani, L. and Baszczynski, C. L. (2000). Engineering herbicide-resistant maize using chimeric RNA/DNA oligonucleotides. *Nat Biotechnol* 18, 555-8.

15 Zhu, T., Peterson, D. J., Tagliani, L., St Clair, G., Baszczynski, C. L. and Bowen, B. (1999). Targeted manipulation of maize genes in vivo using chimeric RNA/DNA oligonucleotides. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96, 8768-73.

LISTADO DE SECUENCIAS

20 **[0130]**
 <110> Keygene N.V.

<120> Alteración dirigida de ADN.

25 <130> 14829-3012

<160> 17

<170> PatentIn version 3.5

30 <210> 1
 <211> 786
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

35 <220>
 <223> ORF de GFP que contiene un codon de parada

<400> 1

40 atgggaagag gatcgcatca ccaccatcat cataagcttc caaagaagaa gaggaaggtt 60

ctcgagatgg tgagcaaggg ctaggagctg ttcaccgggg tgggtgccat cctggtcgag 120

ctggacggcg acgtaaacgg ccacaagttc agcgtgtccg gcgagggcga gggcgatgcc 180

45 acctacggca agctgaccct gaagttcatc tgcaccaccg gcaagctgcc cgtgccctgg 240

cccaccctcg tgaccaccct gacctacggc gtgcagtgtc tcagccgcta ccccgaccac 300

50 atgaagcagc acgacttctt caagtccgcc atgcccgaag gctacgtcca ggagcgcacc 360

atcttcttca aggacgacgg caactacaag acccgcgccg aggtgaagtt cgagggcgac 420

accctggtga accgcatcga gctgaagggc atcgacttca aggaggacgg caacatcctg 480

55 gggcacaagc tggagtacaa ctacaacagc cacaacgtct atatcatggc cgacaagcag 540

aagaacggca tcaaggtgaa cttcaagatc cgccacaaca tcgaggacgg cagcgtgcag 600

60 ctgcccgacc actaccagca gaacacccc atcggcgacg gccccgtgct gctgccccgac 660

aaccactacc tgagcaccca gtccgccctg agcaaagacc ccaacgagaa gcgcgatcac 720

atggtcctgc tggagtctgt gaccgcccgc gggatcactc tcggcatgga cgagctgtac 780

65 aagtaa 786

ES 2 536 638 T3

<210> 2
 <211> 260
 <212> PRT
 5 <213> Secuencia Artificial

 <220>
 <223> Proteína GFP-STOP

 10 <400> 2
 Met Gly Arg Gly Ser His His His His His His His Lys Leu Pro Lys Lys
 1 5 10 15
 15 Lys Arg Lys Val Leu Glu Met Val Ser Lys Gly Glu Leu Phe Thr Gly
 20 20 25 30
 Val Val Pro Ile Leu Val Glu Leu Asp Gly Asp Val Asn Gly His Lys
 35 40 45
 25 Phe Ser Val Ser Gly Glu Gly Glu Gly Asp Ala Thr Tyr Gly Lys Leu
 50 55 60
 30 Thr Leu Lys Phe Ile Cys Thr Thr Gly Lys Leu Pro Val Pro Trp Pro
 65 70 75 80
 35 Thr Leu Val Thr Thr Leu Thr Tyr Gly Val Gln Cys Phe Ser Arg Tyr
 85 90 95
 40 Pro Asp His Met Lys Gln His Asp Phe Phe Lys Ser Ala Met Pro Glu
 100 105 110
 45 Gly Tyr Val Gln Glu Arg Thr Ile Phe Phe Lys Asp Asp Gly Asn Tyr
 115 120 125
 50 Lys Thr Arg Ala Glu Val Lys Phe Glu Gly Asp Thr Leu Val Asn Arg
 130 135 140
 55 Ile Glu Leu Lys Gly Ile Asp Phe Lys Glu Asp Gly Asn Ile Leu Gly
 145 150 155 160
 60 His Lys Leu Glu Tyr Asn Tyr Asn Ser His Asn Val Tyr Ile Met Ala
 165 170 175
 65 Asp Lys Gln Lys Asn Gly Ile Lys Val Asn Phe Lys Ile Arg His Asn
 180 185 190
 70 Ile Glu Asp Gly Ser Val Gln Leu Ala Asp His Tyr Gln Gln Asn Thr
 195 200 205
 75 Pro Ile Gly Asp Gly Pro Val Leu Leu Pro Asp Asn His Tyr Leu Ser
 210 215 220
 Thr Gln Ser Ala Leu Ser Lys Asp Pro Asn Glu Lys Arg Asp His Met

ES 2 536 638 T3

	225		230		235		240									
5	Val	Leu	Leu	Glu	Phe 245	Val	Thr	Ala	Ala	Gly 250	Ile	Thr	Leu	Gly	Met 255	Asp
10	Glu	Leu	Tyr	Lys 260												
15	<210>	3														
	<211>	786														
	<212>	ADN														
	<213>	Secuencia Artificial														
20	<220>															
	<223>	Construcción YFP-STOP														
20	<400>	3														
	atgggaagag	gatcgcatca	ccaccatcat	cataagcttc	caaagaagaa	gaggaaggtt										60
	ctcgagatgg	tttctaaggg	tgaggaactt	ttcactggtg	tggttccaat	tctcgttgag										120
25	cttgatggtg	atgttaacgg	acacaagttc	tctgtttctg	gtgaagggtga	aggtgatgct										180
	acttaaggaa	agcttactct	caagttcatc	tgactactg	gaaagcttcc	agttccatgg										240
30	ccaactcttg	ttactacttt	cggatacggg	gttcaatgct	tcgctaggta	tccagatcat										300
	atgaggcagc	acgatttctt	caagtctgct	atgccagagg	gatatggttca	agagaggact										360
	atcttcttca	aggatgatgg	caactacaag	actagggctg	aggttaagtt	cgagggtgat										420
35	actcttgatga	acaggattga	gcttaagggc	atcgatttca	aagaggatgg	aaacattctc										480
	ggccacaagc	ttgagtacaa	ctacaattct	cacaacgtgt	acatcatggc	tgataagcag										540
40	aagaacggca	tcaagggttaa	cttcaagatc	aggcacaaca	tcgaggatgg	atctgttcaa										600
	cttgctgatc	attaccagca	gaactctcca	attggagatg	gaccagttct	tcttctgat										660
	aaccactacc	tttcttacca	gtctgctctt	tccaaggatc	caaatgagaa	gagggatcac										720
45	atggtgcttt	tggagtttgt	tactgctgct	ggaatcactc	ttggcatgga	tgaactctac										780
	aagtga															786
50	<210>	4														
	<211>	261														
	<212>	PRT														
	<213>	Secuencia Artificial														
55	<220>															
	<223>	Secuencia proteica de YFP-STOP														
	<400>	4														
60	Met	Gly	Arg	Gly	Ser	His	His	His	His	His	His	Lys	Leu	Pro	Lys	Lys
	1				5										15	
65	Lys	Arg	Lys	Val	Tyr	Leu	Glu	Met	Val	Ser	Lys	Gly	Glu	Glu	Leu	Phe
				20					25					30		
	Thr	Gly	Val	Val	Pro	Ile	Leu	Val	Glu	Leu	Asp	Gly	Asp	Val	Asn	Gly

ES 2 536 638 T3

		35		40		45													
5	His	Lys ₅₀	Phe	Ser	Val	Ser	Gly ₅₅	Glu	Gly	Glu	Gly	Asp ₆₀	Ala	Thr	Gly	Lys			
10	Leu ₆₅	Thr	Leu	Lys	Phe	Ile ₇₀	Cys	Thr	Thr	Gly	Lys ₇₅	Leu	Pro	Val	Pro	Trp ₈₀			
15	Pro	Thr	Leu	Val	Thr ₈₅	Thr	Phe	Gly	Tyr	Gly ₉₀	Val	Gln	Cys	Phe	Ala ₉₅	Arg			
20	Tyr	Pro	Asp	His ₁₀₀	Met	Arg	Gln	His	Asp ₁₀₅	Phe	Phe	Lys	Ser	Ala ₁₁₀	Met	Pro			
25	Glu	Gly	Tyr ₁₁₅	Val	Gln	Glu	Arg	Thr ₁₂₀	Ile	Phe	Phe	Lys	Asp ₁₂₅	Asp	Gly	Asn			
30	Tyr	Lys ₁₃₀	Thr	Arg	Ala	Glu	Val ₁₃₅	Lys	Phe	Glu	Gly	Asp ₁₄₀	Thr	Leu	Val	Asn			
35	Arg ₁₄₅	Ile	Glu	Leu	Lys	Gly ₁₅₀	Ile	Asp	Phe	Lys	Glu ₁₅₅	Asp	Gly	Asn	Ile	Leu ₁₆₀			
40	Gly	His	Lys	Leu	Glu ₁₆₅	Tyr	Asn	Tyr	Asn	Ser ₁₇₀	His	Asn	Val	Tyr	Ile ₁₇₅	Met			
45	Ala	Asp	Lys	Gln ₁₈₀	Lys	Asn	Gly	Ile	Lys ₁₈₅	Val	Asn	Phe	Lys	Ile ₁₉₀	Arg	His			
50	Asn	Ile	Glu ₁₉₅	Asp	Gly	Ser	Val	Gln ₂₀₀	Leu	Ala	Asp	His	Tyr ₂₀₅	Gln	Gln	Asn			
55	Thr	Pro ₂₁₀	Ile	Gly	Asp	Gly	Pro ₂₁₅	Val	Leu	Leu	Pro	Asp ₂₂₀	Asn	His	Tyr	Leu			
60	Ser ₂₂₅	Tyr	Gln	Ser	Ala	Leu ₂₃₀	Ser	Lys	Asp	Pro	Asn ₂₃₅	Glu	Lys	Arg	Asp	His ₂₄₀			
65	Met	Val	Leu	Leu	Glu ₂₄₅	Phe	Val	Thr	Ala	Ala ₂₅₀	Gly	Ile	Thr	Leu	Gly ₂₅₅	Met			
70	Asp	Glu	Leu	Tyr ₂₆₀	Lys														
75	<210>	5																	
80	<211>	25																	
85	<212>	ADN																	
90	<213>	Secuencia Artificial																	
95	<220>																		
100	<223>	oligonucleótido																	
105	<400>	5																	

	tgaacagctc ctcgcccttg ctcac	25
5	<210> 6 <211> 25 <212> ADN <213> Secuencia Artificial	
10	<220> <223> oligonucleótido	
	<400> 6 tgaacagctc ctagcccttg ctcac	25
15	<210> 7 <211> 25 <212> ADN <213> Secuencia Artificial	
20	<220> <223> oligonucleótido	
25	<400> 7 gcaccacccc ggtgaacagc tcctc	25
30	<210> 8 <211> 25 <212> ADN <213> Secuencia Artificial	
35	<220> <223> oligonucleótido	
	<400> 8 gtgagcaagg gcgaggagct gttca	25
40	<210> 9 <211> 25 <212> ADN <213> Secuencia Artificial	
45	<220> <223> oligonucleótido	
50	<400> 9 cgcccttgct caccatctcg agaac	25
55	<210> 10 <211> 25 <212> ADN <213> Secuencia Artificial	
60	<220> <223> oligonucleótido	
	<400> 10 caccaccccg gtgaacagct cctca	25
65	<210> 11 <211> 25 <212> ADN <213> Secuencia Artificial	

<220>
 <223> oligonucleótido
 <400> 11
 5 accaccccg g tgaacagctc ctgag 25

<210> 12
 <211> 25
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> oligonucleótido
 <400> 12
 15 ccaccccggt gaacagctcc tcagc 25

<210> 13
 <211> 25
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> oligonucleótido
 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (23)..(23)
 <223> n e s a , c , g , o t
 <400> 13
 35 gcaccacccc ggtgaacagc tcntc 25

<210> 14
 <211> 25
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> oligonucleótido
 <400> 14
 45 gatgaacttg agagtaagct ttccg 25

<210> 15
 <211> 25
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> oligonucleótido
 <400> 15
 60 catgcatgca tgcagcatg catgc 25

<210> 16
 <211> 25
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> oligonucleótido

<400> 16
gatgaactta agtgtaagtt taccg 25

5
<210> 17
<211> 25
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial

10
<220>
<223> oligonucleótido

15
<400> 17
gatgaactta agtgtaagtt taccg 25

REIVINDICACIONES

1. Procedimiento para la alteración dirigida de una secuencia de ADN aceptor de doble cadena que comprende una primera secuencia de ADN y una segunda secuencia de ADN que es el complemento de la primera secuencia de ADN, comprendiendo el procedimiento
5 combinar la secuencia de ADN aceptor de doble cadena con un oligonucleótido donante, en el que el oligonucleótido comprende al menos un dominio que es capaz de hibridarse a la primera secuencia de ADN, cuyo dominio comprende o está directamente adyacente a al menos un desapareamiento con respecto a la primera secuencia de ADN, y en el que dicho al menos un desapareamiento se encuentra como máximo 2 nucleótidos, preferiblemente como máximo 1
10 nucleótido del extremo 3' de dicho oligonucleótido, lo más preferiblemente dicho al menos un desapareamiento está en el extremo 3' del oligonucleótido, en el que el procedimiento no es para el tratamiento de un cuerpo humano o animal mediante terapia o para modificar la identidad genética de la línea germinal de seres humanos.
2. Procedimiento, según la reivindicación 1, en el que el nucleótido donante es complementario a la primera secuencia
15 de ADN con la excepción de un apareamiento.
3. Procedimiento, según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que el oligonucleótido comprende al menos una sección que contiene al menos un nucleótido modificado seleccionado del grupo que consiste en una modificación de bases, una modificación de bases en el extremo 3' y/o 5', una modificación del esqueleto o una modificación de
20 azúcares.
4. Procedimiento, según la reivindicación 3, en el que el nucleótido modificado tiene una mayor afinidad de unión en comparación con nucleótidos A, C, T o G naturales con su nucleótido complementario, y en el que el nucleótido modificado se une más fuerte a un nucleótido en la posición opuesta en la primera secuencia de ADN en comparación
25 con un nucleótido natural complementario al nucleótido en la posición opuesta en la primera secuencia de ADN y/o en el que el nucleótido modificado es un nucleótido resistente a nucleasa.
5. Procedimiento, según cualquiera de las reivindicaciones 3-4, en el que el nucleótido modificado se selecciona del grupo que consiste en LNA o nucleótidos que tienen enlaces fosforotioato.
30
6. Procedimiento, según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que el oligonucleótido comprende al menos dos, tres, cuatro o cinco nucleótidos modificados.
7. Procedimiento, según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que el desapareamiento no es un nucleótido
35 modificado.
8. Procedimiento, según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que el nucleótido modificado es al menos un nucleótido de dicho al menos un desapareamiento situado como máximo 2 nucleótidos, preferiblemente como máximo 1 nucleótido del extremo 3' de dicho oligonucleótido, lo más preferiblemente dicho al menos un desapareamiento está en
40 el extremo 3' del oligonucleótido.
9. Procedimiento, según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que el oligonucleótido acomoda 2, 3 ó 4 desapareamientos.
- 45 10. Procedimiento, según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que la alteración del ADN aceptor de doble cadena está en una célula, preferiblemente seleccionada del grupo que consiste en un célula procariota, una célula bacteriana, una célula eucariota, una célula vegetal, una célula animal, una célula de levadura, una célula fúngica, una célula de roedor, una célula humana, una célula no humana, y/o una célula embrionaria.
- 50 11. Procedimiento, según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que el ADN aceptor de doble cadena se obtiene de un organismo procariota, una bacteria, un organismo eucariota, una planta, un animal, una levadura, un hongo, un roedor o un humano.
- 55 12. Procedimiento, según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que la alteración es una delección, una sustitución y/o una inserción de al menos un nucleótido.
13. Procedimiento, según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que el ADN aceptor de doble cadena es de ADN genómico, ADN lineal, cromosomas artificiales de mamífero, cromosomas artificiales de bacterias, cromosomas artificiales de levadura, cromosomas artificiales de planta, ADN cromosómico nuclear, ADN de orgánulos, ADN
60 plasmídico o ADN episomal.
14. Procedimiento, según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, para alterar una célula, para corregir una mutación mediante la restauración al tipo salvaje, para inducir una mutación, para inactivar una enzima mediante la alteración de la región codificante, para modificar la bioactividad de una enzima mediante la alteración de la región
65 codificante, para modificar una proteína mediante la alteración de la región codificante.

15. Procedimiento para la alteración dirigida de una secuencia de ADN aceptor de doble cadena que comprende una primera secuencia de ADN y una segunda secuencia de ADN que es el complemento de la primera secuencia de ADN, comprendiendo el procedimiento
- 5 combinar la secuencia de ADN aceptor de doble cadena con un oligonucleótido donante, en el que el oligonucleótido comprende al menos un dominio que es capaz de hibridarse a la primera secuencia de ADN, cuyo dominio comprende o está directamente adyacente a al menos un desapareamiento con respecto a la primera secuencia de ADN, y en el que dicho al menos un desapareamiento se encuentra como máximo 2 nucleótidos, preferiblemente como máximo 1 nucleótido del extremo 3' de dicho oligonucleótido, lo más preferiblemente dicho al menos un desapareamiento está en el extremo 3' del oligonucleótido, en el que
- 10 - el procedimiento se realiza ex vivo; y/o
- la alteración de la secuencia de ADN aceptor de doble cadena está en una célula seleccionada del grupo que consiste en una célula procariota, una célula bacteriana, una célula vegetal, una célula de levadura y una célula fúngica.
- 15 16. Utilización de un oligonucleótido, tal como se describe en cualquiera de las reivindicaciones 1-14, para la alteración dirigida de una secuencia de ADN aceptor de doble cadena, preferiblemente, para alterar una célula, corregir una mutación mediante la restauración al tipo salvaje, para inducir una mutación, para inactivar una enzima mediante la alteración de la región codificante, para modificar la bioactividad de una enzima mediante la alteración de la región codificante, para modificar una proteína mediante la alteración de la región codificante, reparación de
- 20 desapareamientos, alteración dirigida de material genético (planta), incluyendo mutación de genes, reparación dirigida de genes y knockout de genes, en la que la utilización no es para el tratamiento de un cuerpo humano o animal mediante terapia o para modificar la identidad genética de la línea germinal de seres humanos.
- 25 17. Utilización de un oligonucleótido, tal como se describe en cualquiera de las reivindicaciones 1-14, para la alteración dirigida de una secuencia de ADN aceptor de doble cadena, preferiblemente, para alterar una célula, corregir una mutación mediante la restauración al tipo salvaje, para inducir una mutación, para inactivar una enzima mediante la alteración de la región codificante, para modificar la bioactividad de una enzima mediante la alteración de la región codificante, para modificar una proteína mediante la alteración de la región codificante, reparación de
- 30 desapareamientos, alteración dirigida de material genético (planta), incluyendo mutación de genes, reparación dirigida de genes y knockout de genes, en la que
- la utilización se realiza ex vivo; y/o
- la alteración de la secuencia de ADN aceptor de doble cadena está en una célula seleccionada del grupo que consiste en una célula procariota, una célula bacteriana, una célula vegetal, una célula de levadura y una célula fúngica.
- 35
- 40
- 45

Figura 1

```

1   ATGGGAAGAG GATCGCATCA CCACCATCAT CATAAGCTTC CAAAGAAGAA GAGGAAGGT
60  TCTCGAGATG GTGAGCAAGG GCTAGGAGCT GTTCACCGGG GTGGTGCCCA TCCTGGTGC
120 AGCTGGACGG CGACGTAAAC GGCCACAAGT TCAGCGTGTC CGGCGAGGGC GAGGGCGAT
180 GCCACCTACG GCAAGCTGAC CCTGAAGTTC ATCTGCACCA CCGCAAGCT GCCCGTGCC
240 CTGGCCCACC CTCGTGACCA CCCTGACCTA CGGCGTGCAG TGCTTCAGCC GCTACCCCG
300 ACCACATGAA GCAGCACGAC TTCTTCAAGT CCGCCATGCC CGAAGGCTAC GTCCAGGAG
360 CGCACCATCT TCTTCAAGGA CGACGGCAAC TACAAGACCC GCGCCGAGGT GAAGTTCGA
420 GGGCGACACC CTGGTGAACC GCATCGAGCT GAAGGGCATC GACTTCAAGG AGGACGGCA
480 ACATCCTGGG GCACAAGCTG GAGTACAAC ACAAACAGCCA CAACGTCTAT ATCATGGCC
540 GACAAGCAGA AGAACGGCAT CAAGGTGAAC TTCAAGATCC GCCACAACAT CGAGGACGG
600 CAGCGTGCAG CTCGCCGACC ACTACCAGCA GAACACCCCC ATCGGCGACG GCCCCGTGC
660 TGCTGCCCGA CAACCACTAC CTGAGCACCC AGTCCGCCCT GAGCAAAGAC CCCAACGAG
720 AAGCGCGATC ACATGGTCCT GCTGGAGTTC GTGACCGCCG CCGGGATCAC TCTCGGCAT
780 GGACGAGCTG TACAAGTAA

```

Figura 2

```
1   MGRGSHHHHH HKLPKKRKY LEMVSKG*EL FTGVVPILVE LDGDVNGHKF
51  SVSGE GEGDA TYGKLT LKFI CTTGKLPVPW PTLVTTLTYG VQCFSRYPDH
101 MKQHDFFKSA MPEGYVQERT IFFKDDGNYK TRAEVKFEGD TLVNRIELKG
151 IDFKEDGNIL GHKLEYNYS HNVYIMADKQ KNGIKVNFKI RHNIEDGSVQ
201 LADHYQQNTP IGDGPVLLPD NHYLSTQSAL SKDPNEKRDH MVLLEFVTAA
251 GITLGMDELY K
```

Figura 3

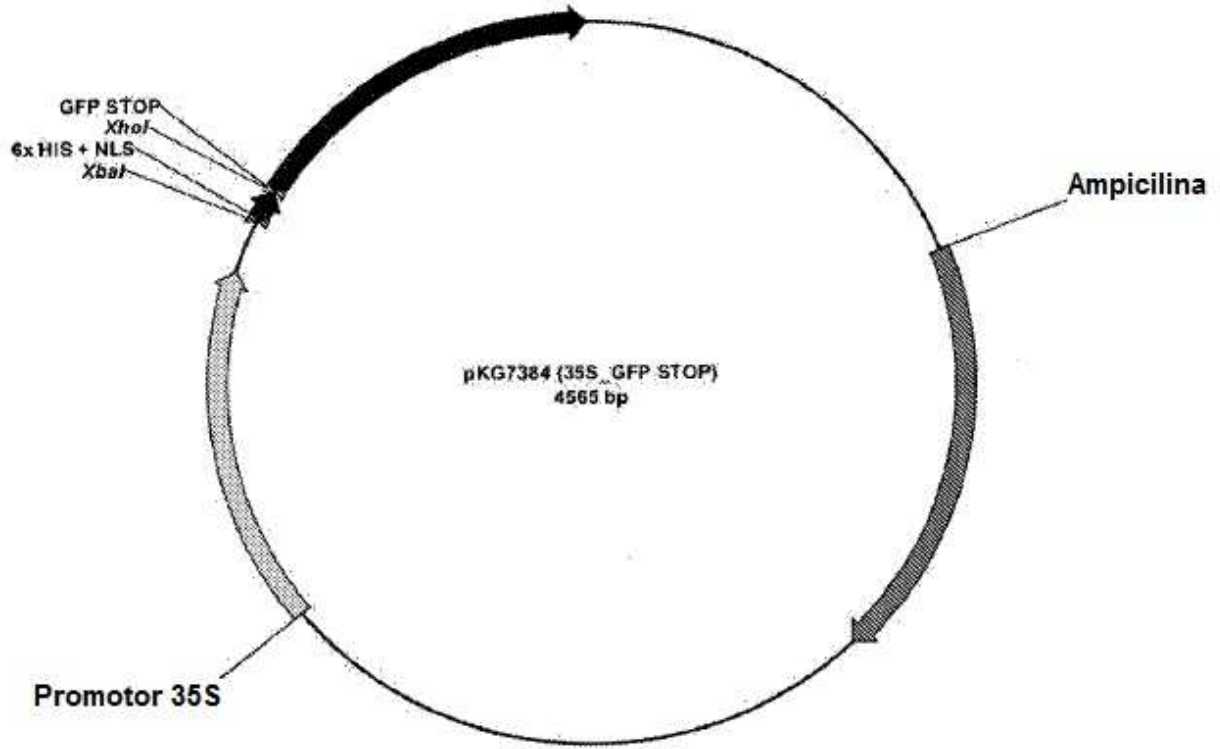


Figura 3 (continuación)

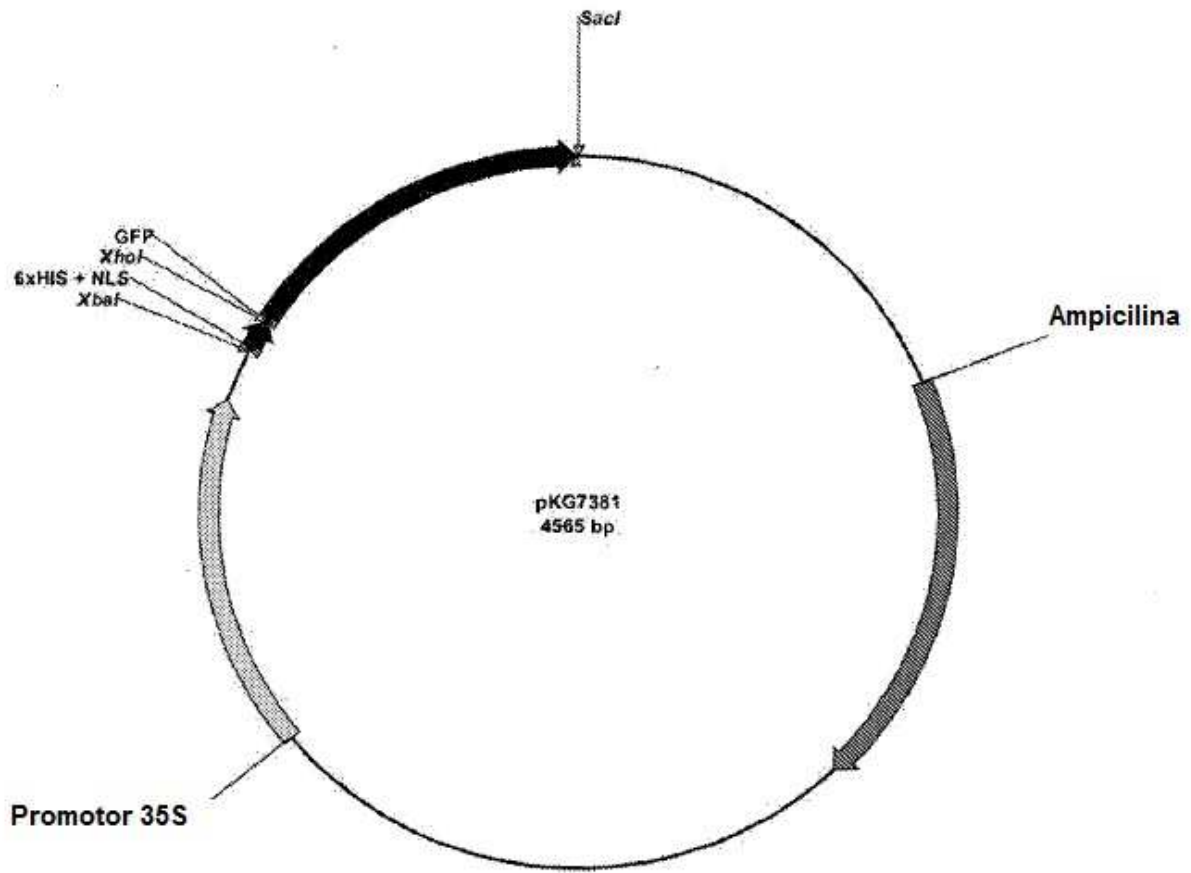


Figura 4

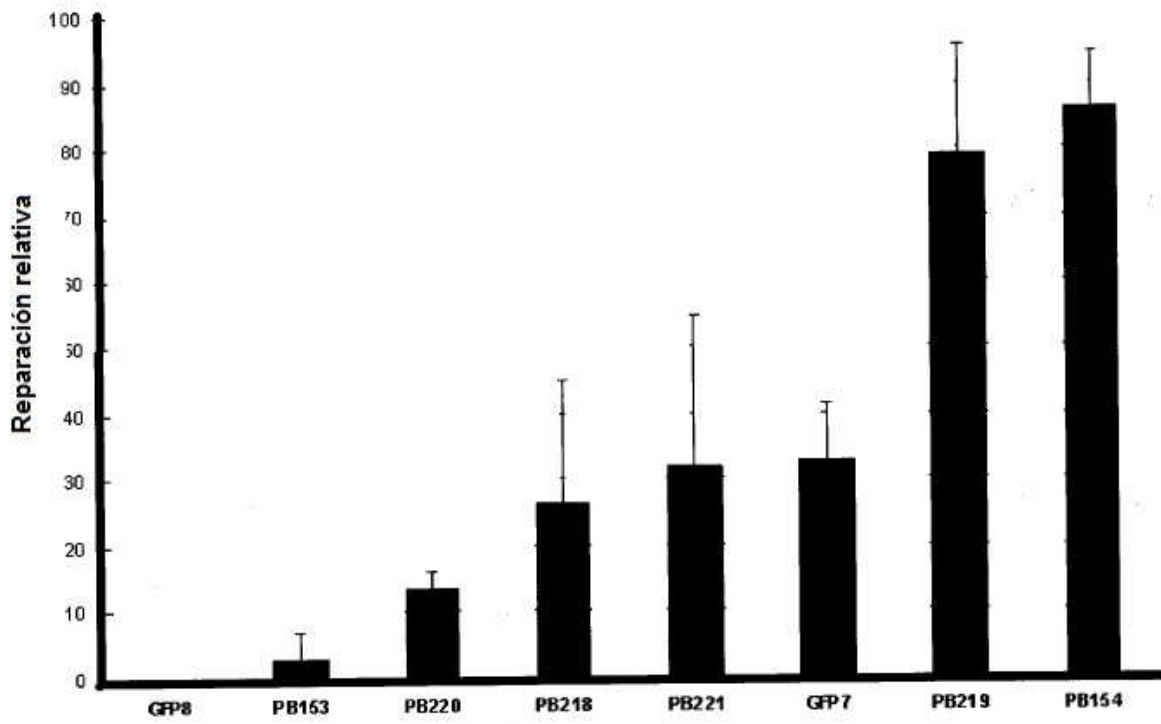


Figura 5

```

1   ATGGGAAGAG GATCGCATCA CCACCATCAT CATAAGCTTC CAAAGAAGAA 51
   GAGGAAGGTT CTCGAGATGG TTTCTAAGGG TGAGGAACTT TTCACTGGTG
101 TGGTTCCAAT TCTCGTTGAG CTTGATGGTG ATGTTAACGG ACACAAGTTC
151 TCTGTTTCTG GTGAAGGTGA AGGTGATGCT ACTTAAGGAA AGCTTACTCT
201 CAAGTTCATC TGCACTACTG GAAAGCTTCC AGTTCCATGG CCAACTCTTG
251 TTACTACTTT CGGATACGGT GTTCAATGCT TCGCTAGGTA TCCAGATCAT
301 ATGAGGCAGC ACGATTTCTT CAAGTCTGCT ATGCCAGAGG GATATGTTCA
351 AGAGAGGACT ATCTTCTTCA AGGATGATGG CAACTACAAG ACTAGGGCTG
401 AGGTTAAGTT CGAGGGTGAT ACTCTTGTGA ACAGGATTGA GCTTAAGGGC
451 ATCGATTTCA AAGAGGATGG AAACATTCTC GGCCACAAGC TTGAGTACAA
501 CTACAATTCT CACAACGTGT ACATCATGGC TGATAAGCAG AAGAACGGCA
551 TCAAGGTAA CTTCAAGATC AGGCACAACA TCGAGGATGG ATCTGTTCAA
601 CTTGCTGATC ATTACCAGCA GAACACTCCA ATTGGAGATG GACCAGTTCT
651 TCTTCCTGAT AACCACTACC TTTCTTACCA GTCTGCTCTT TCCAAGGATC
701 CAAATGAGAA GAGGGATCAC ATGGTGCTTT TGGAGTTTGT TACTGCTGCT
751 GGAATCACTC TTGGCATGGA TGAACTCTAC AAGTGA

```

Figura 6

```
1   MGRGSHHHHH HKLPKKRKY YLEMVSKGEE LFTGVVPILV ELDGDVNGHK
51  FSVSGEGEGD AT*GKLTLLKF ICTTGKLPVP WPTLVTTFGY GVQCFARYPD
101 HMRQHDFFKS AMPEGYVQER TIFFKDDGNY KTRAEVKFEG DTLVNRIELK
151 GIDFKEDGNI LGHKLEYNYN SHNVYIMADK QKNGIKVNFK IRHNIEDGSV
201 QLADHYQQNT PIGDGPVLLP DNHYLSYQSA LSKDPNEKRD HMLLEFVTA
251 AGITLGMDL  YK
```


Figura 7

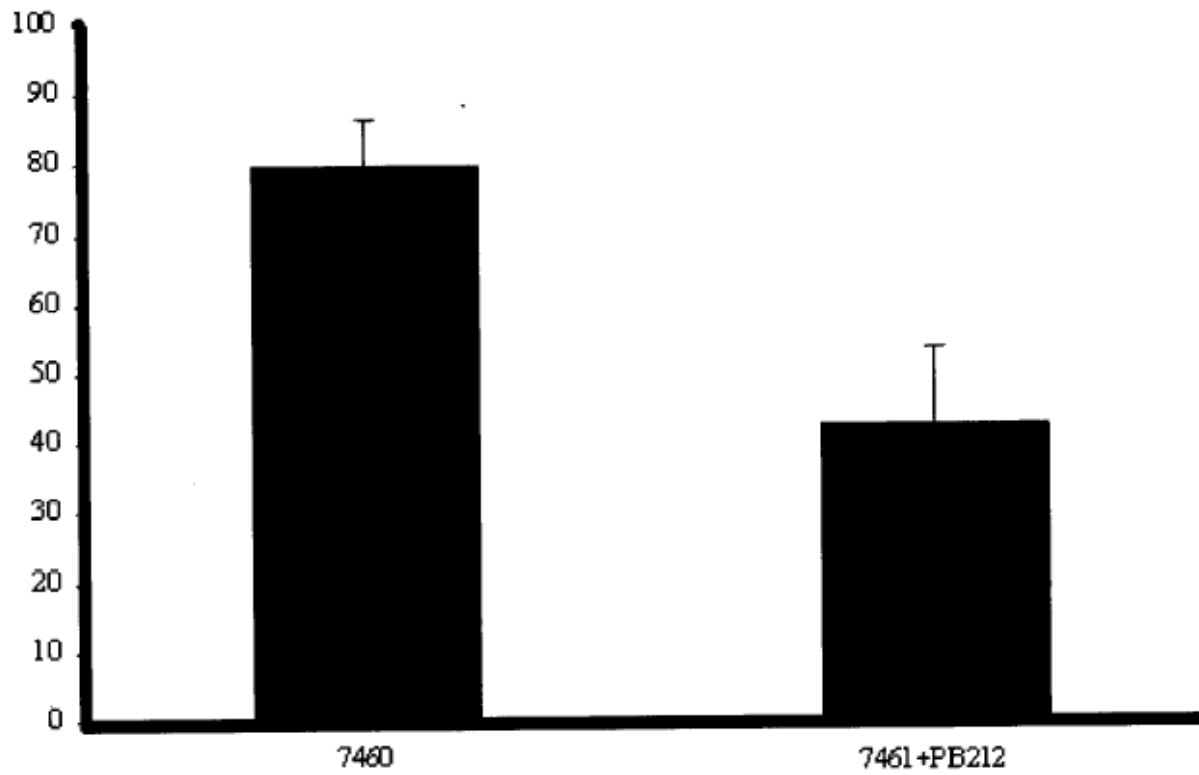


Figura 8

