

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 536 640**

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 11791642 (9)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **18.02.2015 EP 2646550**

54 Título: **Alteración dirigida de ADN con oligonucleótidos**

30 Prioridad:

02.12.2010 US 419183 P
03.12.2010 NL 2005809

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:

DE BOTH, MICHIEL THEODOOR JAN y
FURUKAWA, TOMOYUKI

74 Agente/Representante:

PONTI SALES, Adelaida

ES 2 536 640 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 con oligonucleótidos

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 al menos dos oligonucleótidos, teniendo cada oligonucleótido al menos un desapareamiento con respecto al ADN aceptor (doble cadena) dirigido. El desapareamiento del primer oligonucleótido se dirige a un nucleótido en la primera cadena de la doble cadena y el desapareamiento del segundo oligonucleótido se dirige al nucleótido en la segunda cadena que forma una pareja de bases con el nucleótido en la primera cadena. Estos errores de emparejamiento se encuentran en posiciones específicas en dichos oligonucleótidos. También se proporciona un kit que comprende instrucciones para realizar el procedimiento según las invenciones, y oligonucleótidos adecuados 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 la 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.

[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.

[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 despareamiento está presente al menos a 8 nucleótidos de cada extremo terminal.

[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.

[0014] Andrieu-Soler et al. (2005, Nucleic Acids Research, Vol. 33, No. 12: 3733-3742) describen la transmisión estable de la modificación dirigida de genes que utilizan oligonucleótidos de cadena única con LNA flanqueantes. 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.

[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.

Descripción resumida de la invención

Problema técnico

[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.

[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.

La solución al problema

[0018] La solución al problema se presenta en las reivindicaciones adjuntas.

[0019] El ADN dúplex o de doble cadena es un término muy conocido para el experto y se refiere a las dos cadenas de ADN que se mantienen en una doble hélice por apareamiento de bases complementarias (apareamiento de bases de Watson-Crick) entre A y T y entre G y C.

[0020] Los inventores han encontrado ahora un nuevo procedimiento para la alteración dirigida de una secuencia de ADN de doble cadena que comprende una primera secuencia de ADN (comprendida en la primera cadena) y una segunda secuencia de ADN (comprendida en la segunda cadena) que es el complemento de la primera secuencia de ADN.

[0021] El procedimiento tiene la ventaja de al menos dos oligonucleótidos donantes diferentes y diseñados específicamente. Cada uno de los dos oligonucleótidos donantes comprende un dominio que es capaz de hibridarse con la diana (en condiciones que permiten la hibridación, tal como son conocidas para el experto). Cada uno de los dos

nucleótidos donantes comprende además al menos un desapareamiento en comparación con la secuencia de ADN de doble cadena dirigida, cuyo desapareamiento se va a introducir en la secuencia de ADN de doble cadena dirigida.

5 [0022] El primer oligonucleótido comprende un dominio que es capaz de hibridarse con dicha primera secuencia de ADN (en la primera cadena) y el segundo oligonucleótido comprende un dominio que es capaz de hibridarse con dicha segunda secuencia de ADN (en la segunda cadena).

10 [0023] Dicho al menos un desapareamiento en el primer oligonucleótido se dirige/es relativo a un nucleótido en la primera secuencia de ADN y dicho al menos un desapareamiento en el segundo oligonucleótido se dirige/es relativo al nucleótido en la segunda secuencia de ADN que forma un par de bases con el nucleótido en la primera secuencia de ADN en el ADN doble cadena.

15 [0024] En la técnica se aboga y es de conocimiento común que un desapareamiento en un oligonucleótido 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).

20 [0025] Dicho diseño de oligonucleótido de la técnica, con un desapareamiento en algún lugar en el medio y flanqueado por varios nucleótidos en ambos lados, impediría que cualquier persona experta utilizara un conjunto de al menos dos oligonucleótidos tal como se describe anteriormente, ya que estos oligonucleótidos compartirán al menos parcialmente dominios complementarios que pueden por ejemplo hibridarse entre sí evitando el uso en el intercambio seleccionado de nucleótidos.

25 [0026] Sin embargo, se ha encontrado, sorprendente e inesperadamente, que el procedimiento según la invención, utilizando dichos al menos dos oligonucleótidos descritos en detalle en este documento, se puede realizar con buena eficacia cuando el desapareamiento en cada uno de los oligonucleótidos 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 en dichos al menos dos oligonucleótidos descritos en este documento debe situarse (para cada oligonucleótido de forma independiente) 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).

30 [0027] 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) del 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 tal como se describe en este documento.

35 [0028] Con lo anterior, ahora es posible dirigir al mismo tiempo un nucleótido en la primera secuencia de ADN y el nucleótido en la segunda secuencia de ADN que forman un par de bases con el nucleótido en la primera secuencia de ADN en el ADN de doble cadena mediante el uso de dicho al menos dos oligonucleótidos tal como se describe en este documento, mejorando además inesperadamente el intercambio seleccionado de nucleótidos.

40 [0029] Cada uno de los oligonucleótidos que comprende dicho al menos un desapareamiento cero, uno o como máximo dos nucleótidos(s) del extremo 3' y tal como se describe en el presente documento pueden modificarse adicionalmente mediante la inclusión de nucleótidos modificados, es decir, nucleótidos que tienen una modificación de base, una modificación del esqueleto, una modificación de azúcar 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 de los oligonucleótidos con la secuencia diana y/o para prevenir o inhibir la degradación de los oligonucleótidos 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 2, no se requiere que el primer o el segundo oligonucleótido según la invención incorpore nucleótidos que tienen enlaces fosforotioato ni es necesario que se incorpore cualquier otro tipo de nucleótido modificado.

55 **Breve descripción de los dibujos**

[0030]

60 Figura 1 Secuencia de nucleótidos de la ORF de GFP que contiene un codón de parada (SEQ ID NO: 1).
 Figura 2 Secuencia de aminoácidos de la proteína GFP-STOP. La posición del codón de parada está representado por el asterisco (SEQ ID NO: 2).
 Figura 3 Las construcciones utilizadas en este estudio.
 Figura 4 Los datos que muestran la eficacia del TNE con oligonucleótidos según la invención.
 65 La Figura 5 muestra la secuencia de nucleótidos de la construcción YFP-STOP (SEQ ID NO: 12). El nucleótido en la posición 186 ha sido alterado (C a A), dando lugar a un codón de parada en el marco.

La Figura 6 muestra la secuencia de proteína de YFP-STOP (SEQ ID NO: 13). La posición del codón de parada en la proteína se indica mediante un asterisco.

Definiciones

5

[0031] 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.

10

15

[0032] 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). En particular, la invención descrita en el presente documento se aprovecha de la utilización de al menos dos oligonucleótidos. Cuando en la descripción se hace referencia a "un" o "el" oligonucleótido, esto es debe entenderse por la persona experta que indica la ausencia de uno de dichos al menos dos oligonucleótidos, sino que se debe entender que indica que se hace referencia, independientemente, a uno, dos, o más o todos de dichos al menos dos oligonucleótidos aplicados en el procedimiento según la invención, a menos que el contexto indique claramente lo contrario. Por ejemplo, si se menciona que el oligonucleótido puede comprender un LNA-nucleótido, esto debe entenderse por la persona experta que uno de los oligonucleótidos puede comprender dicho residuo de LNA, pero también que ambos de dichos al menos dos oligonucleótidos pueden comprender dicho residuo de LNA.

20

25

[0033] En este documento y en sus reivindicaciones, el verbo "comprender" y sus conjugaciones se utiliza en su sentido no limitativo en el sentido de que los elementos siguientes a la palabra están incluidos, pero que los elementos que no se mencionan específicamente no se excluyen.

30

[0034] 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.

35

40

[0035] 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.

45

50

[0036] 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.

55

60

[0037] "Intercambio seleccionado de nucleótidos" o "TNE": Intercambio seleccionado de nucleótidos (TNE) es un proceso por el cual al menos 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

[0038] En un aspecto, la invención se refiere a un 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.

5 **[0039]** El procedimiento comprende combinar una/la secuencia de ADN aceptor de doble cadena con al menos dos oligonucleótidos donantes, siendo un primer oligonucleótido y un segundo oligonucleótido. El primer oligonucleótido
 10 comprende al menos un dominio que es capaz de hibridarse a la primera secuencia de ADN y comprende además al menos un desapareamiento con respecto a la primera secuencia de ADN. Este al menos un desapareamiento se encuentra como máximo 2 nucleótidos del extremo 3' de dicho primer oligonucleótido. Preferiblemente, el
 15 desapareamiento se encuentra como máximo 1 nucleótido del extremo 3' de dicho oligonucleótido, incluso más preferiblemente el desapareamiento está 0 nucleótidos del extremo 3' de dicho oligonucleótido, en otras palabras, está en el extremo 3' de dicho oligonucleótido. El segundo oligonucleótido comprende al menos un dominio que es capaz de
 20 hibridarse con la segunda secuencia de ADN y comprende además al menos un desapareamiento con respecto a la segunda secuencia de ADN. Este al menos un desapareamiento se encuentra como máximo 2 nucleótidos del extremo 3' de dicho segundo oligonucleótido. Preferiblemente, el desapareamiento se encuentra como máximo 1 nucleótido del
 25 extremo 3' de dicho oligonucleótido, incluso más preferiblemente el desapareamiento está 0 nucleótidos del extremo 3' de dicho oligonucleótido, en otras palabras, está en el extremo 3' de dicho oligonucleótido. Dicho al menos un desapareamiento en el primer oligonucleótido es relativo a un nucleótido en la primera secuencia de ADN de la
 secuencia de ADN aceptor de doble cadena y dicho al menos un desapareamiento en el segundo oligonucleótido es relativo a un nucleótido en la segunda secuencia de ADN del ADN aceptor de doble cadena, en el que dichos nucleótidos ocupan posiciones complementarias en el ADN aceptor de doble cadena (es decir, pueden formar un par de bases en el ADN aceptor de doble cadena). En otras palabras, dichos al menos dos oligonucleótidos reconocen el mismo par de bases en el ADN aceptor de doble cadena, el desapareamiento del primer oligonucleótido reconoce el nucleótido en la primera secuencia de ADN y el desapareamiento del segundo nucleótido reconoce el nucleótido complementario en la segunda secuencia de ADN en el ADN de doble cadena.

30 **[0040]** En otras palabras, se proporciona un 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 combinar el ADN aceptor de doble
 35 cadena con al menos dos oligonucleótidos, en el que el primer oligonucleótido comprende un dominio que es capaz de hibridarse a la primera secuencia de ADN y comprende además un desapareamiento con respecto a un nucleótido en la primera secuencia de ADN y el segundo oligonucleótido comprende un dominio que es capaz de hibridarse con la segunda secuencia de ADN y comprende además un desapareamiento con respecto a un nucleótido en la segunda
 40 secuencia de ADN y en el que dichos nucleótidos en la primera secuencia de ADN y la segunda secuencia de ADN ocupan posiciones complementarias en el ADN aceptor de doble cadena (por ejemplo, forman un par de bases en el ADN aceptor de doble cadena), y en el que, independientemente, el desapareamiento en el primer oligonucleótido y el desapareamiento en el segundo oligonucleótido se encuentran como máximo 2 nucleótidos del extremo 3' de dicho oligonucleótido.

45 **[0041]** Como se mencionó anteriormente, cada oligonucleótido de dichos al menos dos oligonucleótidos según la invención comprende un dominio que es capaz de hibridarse con la primera o la segunda secuencia de ADN (en condiciones que permiten la hibridación, como se conocen por el experto). Preferiblemente, el dominio que es capaz de hibridarse con la primera secuencia de ADN comprende al menos un desapareamiento con respecto a la primera
 50 secuencia de ADN, o el desapareamiento se encuentra directamente adyacente a dicho dominio (siempre que el desapareamiento esté como máximo 2 nucleótidos del extremo 3' de dicho oligonucleótido). Preferiblemente, el dominio que es capaz de hibridarse con la segunda secuencia de ADN comprende al menos un desapareamiento con respecto a la segunda secuencia de ADN, o el desapareamiento se encuentra directamente adyacente a dicho dominio (siempre que el desapareamiento esté como máximo 2 nucleótidos del extremo 3' de dicho oligonucleótido).

55 **[0042]** 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 dirigidos a ambas cadenas del ADN de doble cadena y cada uno dirigido a un nucleótido diferente del mismo par de bases tal como están presentes en el ADN de doble cadena.

60 **[0043]** 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 dichos al menos dos oligonucleótidos según la invención, es decir, un primer oligonucleótido que tiene, en comparación con la primera secuencia de ADN a la que puede hibridarse, 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 y un segundo oligonucleótido que tiene, en comparación con la segunda secuencia de ADN a la que puede hibridarse, al menos un
 65 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, y en el que el desapareamiento en el primer oligonucleótido y el desapareamiento en el segundo oligonucleótido están cada uno dirigido a un nucleótido diferente del mismo par de bases en el ADN doble cadena.

[0044] Lo más preferiblemente, dicho al menos un desapareamiento está en el extremo 3' del oligonucleótido, aún más preferiblemente dicho al menos un desapareamiento está en el extremo 3' en ambos oligonucleótidos. El resultado del procedimiento es la alteración dirigida en una cadena 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.

[0045] 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.

[0046] 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.

[0047] Los oligonucleótidos utilizados en el procedimiento descrito en el presente documento son preferiblemente de cadena única y comprenden al menos un dominio que es capaz de hibridarse con la primera secuencia de ADN (el primer oligonucleótido) o la segunda secuencia de ADN (el segundo oligonucleótido).

[0048] Para cada uno de los dos oligonucleótidos, y de forma independiente uno del otro, dicho al menos un desapareamiento con respecto a la secuencia de ADN 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 (para el primer oligonucleótido) o la segunda (para el segundo oligonucleótido) secuencia de ADN o está directamente adyacente al dominio.

[0049] Dicho al menos un dominio en el oligonucleótido puede comprender por tanto al menos un desapareamiento con respecto a la secuencia de ADN a alterar o es directamente el siguiente/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 o segunda secuencia de ADN de la secuencia de ADN aceptor de doble cadena, y, comprende un desapareamiento con respecto a dicha primera o segunda 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).

[0050] 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. 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.

[0051] Debe entenderse que las opciones con respecto a la posición del desapareamiento en cada uno de dichos al menos dos oligonucleótidos pueden ser independientemente del otro oligonucleótido. En otras palabras, en caso de que el desapareamiento en el primer oligonucleótido se encuentre, por ejemplo, en el extremo 3' de dicho oligonucleótido, el desapareamiento en el segundo oligonucleótido no necesariamente debe encontrarse en el extremo 3' de dicho oligonucleótido, pero también puede encontrarse, por ejemplo, como máximo, 2 nucleótidos del extremo 3' de dicho oligonucleótido.

[0052] 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 o segunda 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.

[0053] En realizaciones preferidas, el primer oligonucleótido comprende preferiblemente no más de un desapareamiento con respecto a la primera secuencia de ADN, y/o el segundo oligonucleótido comprende preferiblemente no más de un desapareamiento con respecto a la segunda secuencia de ADN (ambos dirigidos a un nucleótido diferente de un par de bases tal como están presentes en el ADN de doble cadena).

[0054] 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 alejadas (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.

[0055] Se entenderá por el experto que los oligonucleótidos según la invención pueden comprender además partes que no se hibridan, en otras palabras, nucleótidos adyacentes que no se hibridan con la primera o segunda secuencia de ADN, por ejemplo, cuando estas partes no son complementarias a ninguna secuencia en la primera o segunda secuencia de ADN.

[0056] En una realización preferida, el primer 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 a alterar y el segundo oligonucleótido comprende un dominio que es capaz de hibridarse a la segunda secuencia de ADN y comprende, o está directamente adyacente a al menos un desapareamiento, preferiblemente un desapareamiento con respecto a la secuencia de ADN a alterar, en el que dicho al menos un desapareamiento en el primer oligonucleótido es relativo a un nucleótido en la primera secuencia de ADN de la secuencia de ADN aceptor de doble cadena y en el que dicho al menos un desapareamiento en el segundo oligonucleótido es relativo a un nucleótido en la segunda secuencia de ADN del ADN aceptor de doble cadena, y en el que dichos nucleótidos ocupan posiciones complementarias en el ADN aceptor de doble cadena (por ejemplo, forman un par de bases en el ADN aceptor de doble cadena).

[0057] En dicha realización, el oligonucleótido puede, en principio, comprender más de un dominio que es capaz de hibridarse a la respectiva primera o segunda 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, preferiblemente ambos oligonucleótidos, comprenden 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.

[0058] 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.

[0059] 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.

[0060] Los oligonucleótidos según la invención comprenden al menos un desapareamiento que se encuentra como máximo 2, preferiblemente como máximo 1 nucleótido del extremo 3' de dicho oligonucleótido. Preferiblemente, dicho (al menos un) desapareamiento está en el extremo 3' del oligonucleótido, lo más preferiblemente, dicho (al menos un) desapareamiento está en el extremo 3' del oligonucleótido, tanto en el primer oligonucleótido como en el segundo 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").

[0061] 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.

[0062] 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 del extremo 3'" indica que el desapareamiento es el nucleótido en el extremo 3' del oligonucleótido.

[0063] En una realización preferida del procedimiento descrito en el presente documento, el desapareamiento en el primer oligonucleótido o el desapareamiento en el segundo oligonucleótido está situado, independientemente, como máximo 1 nucleótido del extremo 3' de dicho oligonucleótido, más preferiblemente dicho al menos un desapareamiento está en el extremo 3' del oligonucleótido, preferiblemente el desapareamiento en ambos oligonucleótidos está en el extremo 3' de los oligonucleótidos respectivos.

[0064] También se prefiere en el procedimiento descrito en el presente documento que el dominio en el primer oligonucleótido y/o en el segundo oligonucleótido comprenda o sea directamente adyacente a dicho al menos un desapareamiento.

5

[0065] Además, preferiblemente en el procedimiento descrito en el presente documento, el primer oligonucleótido es complementario a la primera secuencia de ADN excepto por el desapareamiento y/o el segundo oligonucleótido es complementario a la segunda secuencia de ADN excepto por el desapareamiento. En dicha realización, el primer oligonucleótido comprende por lo tanto un desapareamiento con respecto a la primera secuencia de ADN y el segundo oligonucleótido comprende un desapareamiento con respecto a la segunda secuencia de ADN (cada uno directo a un nucleótido diferente de un par de bases en el ADN doble cadena). Dicho oligonucleótido es complementario a la primera o segunda 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 o segunda secuencia de ADN en toda la longitud del oligonucleótido hasta la posición del desapareamiento (situado 2, 1 ó 0 nucleótidos del extremo 3'). Incluso más preferiblemente, el desapareamiento en el primer oligonucleótido está en el extremo 3' y el desapareamiento en el segundo oligonucleótido está en el extremo 3', y el primer oligonucleótido es complementario a la primera secuencia de ADN en toda la longitud del oligonucleótido, a excepción del desapareamiento, y el segundo oligonucleótido es complementario a la segunda secuencia de ADN en toda la longitud del oligonucleótido, a excepción del desapareamiento.

10

15

20

[0066] En otra realización preferida del procedimiento descrito en el presente documento, el primer oligonucleótido y/o el segundo oligonucleótido comprende al menos una sección que contiene al menos un nucleótido modificado, en el que la modificación se selecciona del grupo que consiste en una modificación de base, una modificación de bases del extremo 3' y/o 5', una modificación del esqueleto o una modificación del azúcar.

25

[0067] 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 2, no se requiere que el primero o el segundo oligonucleótido incorporen cualquier nucleótido modificado.

30

[0068] 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.

35

[0069] Ventajosamente, aunque no es esencial para la invención, el primer y/o el segundo oligonucleótido para el uso en el procedimiento según la invención puede comprender nucleótidos modificados. En caso de que tanto el primero como el segundo oligonucleótido comprendan una modificación o modificaciones, las modificaciones del primero pueden ser las mismas o diferentes de las modificaciones del segundo. En particular, cualquiera de las modificaciones descritas a continuación se puede incorporar en el primer y/o el segundo oligonucleótido según la invención.

40

[0070] Por ejemplo, el primer y/o el segundo oligonucleótido puede comprender una modificación o modificaciones que aumentan la resistencia del oligonucleótido frente a las nucleasas celulares, si se compara con los nucleótidos A, C, T o G naturales. 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 primer y/o segundo oligonucleótidos 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 A, C, T o G naturales. Alternativamente, o al mismo tiempo, el primer y/o el segundo oligonucleótidos 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 A, C, T o G naturales. Dichos nucleótidos modificados pueden situarse en cualquier posición dentro del primer y/o el segundo 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 respectivo, 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' de los oligonucleótidos, se prefiere particularmente que dicho nucleótido o nucleótidos modificados proteja la parte 3' frente a nucleasas celulares y por lo tanto se encuentren en el extremo 3' del primer y/o el segundo 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 2, no es

45

50

55

60

65

esencial para la invención que el oligonucleótido incluya de hecho nucleótidos modificados que aumentan la resistencia del oligonucleótido frente a las nucleasas celulares.

5 [0071] 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 primer y/o el segundo 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.

15 [0072] Alternativamente o adicionalmente a los nucleótidos modificados que confieren resistencia a las nucleasas descritos anteriormente, el primer y/o el segundo 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 A, C, T o G naturales. 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 primer y/o el segundo 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 A, C, T o G naturales. Dichos nucleótidos modificados tal como se mencionó anteriormente se pueden encontrar en cualquier posición dentro del primer y/o el segundo 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 primer y/o el segundo oligonucleótido.

35 [0073] 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 A, C, T o G naturales, 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 A, C, T o G naturales, como es conocido por un experto.

40 [0074] La determinación de si un nucleótido modificado confiere una mayor resistencia frente a las nucleasas celulares si se compara con los nucleótidos A, C, T o G naturales 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 A, C, T o G naturales. 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 A, C, T o G naturales 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 A, C, T o G naturales.

55 [0075] 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 o segunda 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.

60 [0076] 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 naturales A, C, T o G con su nucleótido complementario.

5 [0077] Las modificaciones de bases incluyen, pero sin limitación, modificaciones tales como, por ejemplo, las descritas en WO0226967, 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.

15 [0078] Las modificaciones en los extremos (3' y/o 5') pueden incluir bases de 2'-O-metilo, grupos 3' amina, enlaces fosforotioato, 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.

20 [0079] Las diversas modificaciones del esqueleto, tales como las mencionados en WO0226967, 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.

25 [0080] 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.

30 [0081] 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.

35 [0082] Todos estos tipos de modificaciones son bien conocidos para el experto y están fácilmente disponibles de diversas fuentes comerciales. Se entenderá por el experto que la modificación puede introducirse en el primer oligonucleótido independientemente del segundo oligonucleótido utilizado en el procedimiento descrito en el presente documento. Por ejemplo, el primer oligonucleótido puede comprender dichas modificaciones tal como se describen anteriormente, mientras que el segundo oligonucleótido no. Alternativamente, el primer oligonucleótido puede comprender más, menos o diferentes modificaciones en las mismas o en diferentes posiciones en el oligonucleótido en comparación con el segundo oligonucleótido.

45 [0083] En una realización, se proporciona un procedimiento según la invención en el que un nucleótido modificado se incorpora en el oligonucleótido, o en ambos, y en el que el nucleótido modificado tiene una mayor afinidad de unión en comparación con los nucleótidos naturales A, C, T o G 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 o segunda secuencia de ADN en comparación con un nucleótido natural complementario al nucleótido en la posición opuesta en la primera o segunda secuencia de ADN y/o en el que el nucleótido modificado es un nucleótido resistente a la nucleasa.

50 [0084] 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.

60 [0085] 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 naturales A, C, T o G 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 o segunda secuencia de ADN en comparación con un nucleótido natural complementario al nucleótido en la posición opuesta en la primera o segunda 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).

65

[0086] 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.

[0087] 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.

[0088] 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.

[0089] Una vez más, se entenderá por el experto que las modificaciones pueden introducirse en el primer oligonucleótido independientemente del segundo oligonucleótido utilizado en el procedimiento descrito en el presente documento. Por ejemplo, el primer oligonucleótido puede comprender dichas modificaciones tal como se describe anteriormente, mientras que el segundo oligonucleótido no. Alternativamente, el primer oligonucleótido puede comprender más, menos o diferentes modificaciones en la misma o en diferentes posiciones en el oligonucleótido en comparación con el segundo oligonucleótido.

[0090] En una realización preferida, el nucleótido modificado se selecciona del grupo que consiste de LNA y/o nucleótidos que tiene enlaces/uniones fosforotioato.

[0091] 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.

[0092] 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.

[0093] 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.

[0094] 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.

[0095] 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).

[0096] 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.

5 **[0097]** Tal como se mencionó anteriormente, preferiblemente, un LNA está al menos un nucleótido de distancia de un desapareamiento en un (o ambos de dichos al menos dos oligonucleótidos) 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.

15 **[0098]** 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.)

20 **[0099]** Los enlaces fosforotioato se pueden incorporar, sin embargo, en cualquier posición deseada en el oligonucleótido.

25 **[0100]** 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.

30 **[0101]** 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.

35 **[0102]** 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.

40 **[0103]** 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.

45 **[0104]** 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 por ejemplo un enlace fosforotioato, dicho enlace puede estar directamente adyacente al desapareamiento de nucleótidos.

55 **[0105]** 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 célula humana, una célula no humana, y/o una célula embrionaria no humana. En una realización preferida, la célula es una célula vegetal.

- 5 [0106] 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 procarionta, 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).
- 10 [0107] En una realización de la invención, la alteración de la secuencia de ADN de doble cadena aceptor es una deleción, una sustitución y/o una inserción de al menos un nucleótido. Preferiblemente, la alteración de la secuencia de ADN de doble cadena es una deleción, 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 (o en otras palabras, se modifica un par de bases en el ADN de doble cadena). 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 nucleótidos, lo más preferiblemente un nucleótido.
- 15 [0108] 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.
- 20 [0109] 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.
- 25 [0110] 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.
- 30 [0111] 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.
- 35 [0112] 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.
- 40 [0113] La invención se refiere además a kits, que comprenden ambos de los oligonucleótidos utilizados en el procedimiento según la invención, y tal como se define en el presente documento, opcionalmente en combinación con proteínas que son capaces de TNE.
- 45 [0114] En particular, el kit comprende instrucciones para la alteración dirigida de un ADN de doble cadena según el procedimiento descrito y reivindicado en el presente documento. Las instrucciones comprenden esencialmente una descripción de las etapas del procedimiento según la invención descrita en el presente documento.
- 50 [0115] En particular, se proporciona un kit que comprende instrucciones para realizar un procedimiento para la alteración dirigida de un ADN aceptor de doble cadena según la invención y tal como se describe en el presente documento, en el que el kit comprende además al menos dos oligonucleótidos para utilizar en el procedimiento tal como se describe aquí, preferiblemente dichos al menos dos oligonucleótidos tal como se describe aquí.
- 55 [0116] En esta realización, el kit puede comprender por lo tanto al menos un primer y un segundo oligonucleótido que, independientemente, comprenden cada uno al menos un dominio que es capaz de hibridarse con, respectivamente, la primera o segunda secuencia de ADN y cuyo dominio comprende, o está directamente adyacente a al menos un desapareamiento con respecto a, respectivamente, la primera o segunda secuencia de ADN, 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 en el que el desapareamiento en el primer oligonucleótido y el desapareamiento en el segundo oligonucleótido reconocen cada uno un nucleótido diferente, en el que el nucleótido reconocido en la primera cadena ocupa la posición
- 60
- 65

complementaria del nucleótido reconocido en la segunda cadena, por ejemplo, los nucleótidos forman un par de bases en el ADN de doble cadena, y además comprende instrucciones para llevar a cabo el procedimiento según la invención.

5 [0117] 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 u oligonucleótidos o 1 nucleótido del extremo 3' o 2 nucleótidos del extremo 3', y que el oligonucleótido u oligonucleótidos se pueden utilizar para la alteración de una secuencia de ADN de doble cadena, comprendiendo dicho kit estas instrucciones y el oligonucleótido u oligonucleótidos son un kit dentro del alcance de los kits descritos anteriormente y reivindicados.

10 [0118] 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 u oligonucleótidos adecuados para utilizar en el procedimiento según la invención, y tal como se ha descrito y se describe en el presente documento.

15 [0119] En una realización preferida, se proporciona un kit según la invención, 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.

25 [0120] En una realización preferida, se proporciona un kit en el 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, el primer oligonucleótido comprende al menos un dominio que es capaz de hibridarse a la primera secuencia de ADN y en el que el primer oligonucleótido comprende además 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 del extremo 3' de dicho primer oligonucleótido; y en el que el segundo oligonucleótido comprende al menos un dominio que es capaz de hibridarse con la segunda secuencia de ADN y en el que el segundo oligonucleótido comprende además al menos un desapareamiento con respecto a la segunda secuencia de ADN y en el que dicho al menos un desapareamiento se encuentra como máximo 2 nucleótidos del extremo 3' de dicho segundo oligonucleótido; y en el que dicho al menos un desapareamiento en el primer oligonucleótido es relativo a un nucleótido en la primera secuencia de ADN de la secuencia de ADN aceptor de doble cadena y en el que dicho al menos un desapareamiento en el segundo oligonucleótido es relativo a un nucleótido en la segunda secuencia de ADN del ADN aceptor de doble cadena, y en el que dichos nucleótidos ocupan posiciones complementarias en el ADN aceptor de doble cadena (por ejemplo, forman un par de bases en el ADN aceptor de doble cadena).

40 [0121] Tal como se entenderá por el experto, en una realización preferida, el desapareamiento en el primer oligonucleótido y el desapareamiento en el segundo oligonucleótido, cada uno dirigido a un nucleótido diferente en un (mismo) par de bases en el ADN de doble cadena, es preferiblemente de manera que cuando ambos desapareamientos se introduzcan en el ADN de doble cadena, estos son complementarios entre sí y pueden formar un par de bases (A-T/C-G) en el ADN de doble cadena en la que se introducen.

45 **Ejemplos:**

Ejemplo 1: TNE en un episoma de GFP en protoplastos de tabaco utilizando 2 oligonucleótidos

50 [0122] 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.

[0123] 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. Se diseñaron dos oligonucleótidos llevando cada uno en el extremo 3' un nucleótido de desapareamiento que podría reparar el codón de parada en GFP. La cotransfección del plásmido junto con los dos oligonucleótidos restauró 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.

60 **Materiales y procedimientos**

Construcciones

65 [0124] 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.

10 Oligonucleótidos

[0125] Los oligonucleótidos para reparar el codón de parada en el gen de GFP se muestran en la tabla 1.

15 **Tabla 1.** Oligonucleótidos utilizados en este estudio. Se subraya el nucleótido de desapareamiento en ODM3 y ODM4. 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'.

Oligo	Secuencia	Orientación
ODM1	G*T*T*C*TCGAGATGGTGAGCAAG*G*G*C*T (SEQ ID NO: 3)	Sentido
ODM2	G*C*A*C*CACCCCGGTGAACAGCT*C*C*T*A (SEQ ID NO: 4)	Antisentido
ODM3	G*T*T*C*TCGAGATGGTGAGCAAG*G*G*C*G (SEQ ID NO: 5)	Sentido
ODM4	G*C*A*C*CACCCCGGTGAACAGCT*C*C*T*C (SEQ ID NO: 6)	Antisentido

20 Aislamiento y transfección de protoplastos de tabaco

[0126] 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.

[0127] 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.

[0128] 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.

[0129] 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 $\cdot\text{kg}^{-1}$.

[0130] 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 $\cdot\text{kg}^{-1}$, y finalmente con los protoplastos resuspendidos en medio ML, que es medio MLm con manitol sustituido por sacarosa.

[0131] 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

5

[0132] 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.

10

15

[0133] Después del tratamiento de electroporación, los protoplastos se colocaron en hielo durante 30 min para recuperación, a continuación se resuspendieron en medio de cultivo T_0 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 T_0 contenía (por litro, pH 5,7) 950 mg KNO_3 , 825 mg NH_4NO_3 , 220 mg $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 185 mg $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 85 mg KH_2PO_4 , 27,85 mg $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 37,25 mg $\text{Na}_2\text{EDTA} \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 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 osmolalidad de 540 $\text{mOsm} \cdot \text{kg}^{-1}$. Los protoplastos se examinaron bajo el microscopio UV 20 horas después de la electroporación para visualizar la señal de GFP en el núcleo.

20

[0134] 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.

25

Resultados

30

[0135] 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.

35

[0136] 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 los oligonucleótidos descritos anteriormente. La señal de GFP se anotó después de 24 horas y los resultados se muestran en la tabla 2.

40

Tabla 2. Reparación de GFP episomal

Tratamiento	Oligonucleótido(s)	Eficacia de reparación (%)
1	ODM1	0
2	ODM2	0
3	ODM3	20
4	ODM4	14
5	ODM1 + ODM2	0
6	ODM3 + ODM4	80

[0137] La eficacia de reparación se calculó como el porcentaje de células con expresión de GFP restaurada evaluada a través de fluorescencia.

45

[0138] Cuando se añadieron por separado oligonucleótidos que carecen de un desapareamiento en el extremo 3' (ODM1 y ODM2) (tratamiento 1 y 2) o juntos (tratamiento 5) no se observó restauración de la actividad de GFP. En cambio, sí se observó restauración de la expresión de GFP cuando se utilizaron oligonucleótidos que llevan un único desapareamiento en el extremo 3' (ODM3 y ODM4) (tratamiento 3 y 4). Sorprendentemente, los inventores fueron capaces de demostrar que la eficacia de reparación fue mayor de lo esperado cuando se añadieron ODM3 y ODM4 simultáneamente. Por lo tanto, este enfoque parece mejorar significativamente la eficacia de TNE y permite el desarrollo de una metodología de TNE más eficaz.

50

Ejemplo 2. Efectos del enlace PS en la eficacia de TNE

55

[0139] Este ejemplo muestra que no se requiere que el primero o el segundo oligonucleótido según la invención incorpore nucleótidos que tienen por ejemplo, enlaces fosforotioato ni es necesario que se incorpore cualquier otro tipo de modificación.

Procedimientos

[0140] 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) (véanse las figuras 5 y 6), 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.

[0141] Secuencia de los oligonucleótidos analizados:
 PB72 C*A*T*G*CATGCATGCATGCATGC*A*T*G*C
 (SEQ ID NO: 7) 25 mer, PS, sin sentido (= control negativo)
 PB242 T*G*A*G*GGTGAAGGTGATGCTAC*T*T*A*C
 (SEQ ID NO: 8) 25 mer, PS, 3' MM (= desapareamiento) Sentido
 PB243 G*A*T*G*AACTTAAGTGAAGTTT*A*C*C*G
 (SEQ ID NO: 9) 25 mer, PS, 3' MM antisentido
 TF7 TGAGGGTGAAGGTGATGCTACTTAC
 (SEQ ID NO: 10) 25 mer, 3' MM Sentido
 TF8 GATGAACTTAAGTGAAGTTTACCG
 (SEQ ID NO: 11) 25 mer, 3' MM antisentido
 * representa un enlace fosforotioato

[0142] La reacción de TNE causada por PB242, PB243, TF7, y TF8 convierte la secuencia diana de TAA a TAC. Los oligonucleótidos PB242, PB243, TF7 y TF8 fueron así diseñados para reparar el codón de parada en YFP, donde PB72, PB242 y PB243 comprenden enlaces PS, y TF7 y TF8 no comprenden enlaces PS. Tal como se muestra en la figura 4, PB242 + PB243 fue capaz de restaurar la expresión de YFP con más del 23%; TF7 + TF8 fue capaz de restaurar la expresión de YFP con más del 3%, casi 10 veces más en comparación con la señal obtenida con el oligonucleótido sin sentido.

[0143] 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.

Literatura**[0144]**

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.

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.

Ruiter, 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 chimeraplasty. *Plant Mol Biol* 53, 675-89.

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

Zhu, T., Peterson, D. J., Tagliani, L., St Clair, G., Baszczyński, 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**[0145]**

ES 2 536 640 T3

<110> Keygene N.V.
 <120> Alteración dirigida de AND con oligonucleótidos
 5 <130> 14829-3013
 <160> 13
 <170> PatentIn version 3.5
 10 <210> 1
 <211> 786
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 15 <220>
 <223> ORF de GFP que contiene un codon de parada
 <400> 1
 20 atgggaagag gatcgcatca ccaccatcat cataagcttc caaagaagaa gaggaaggtt 60
 ctcgagatgg tgagcaaggg ctaggagctg ttcaccgggg tggtgcccat cctggtcgag 120
 ctggacggcg acgtaaacgg ccacaagttc agcgtgtccg gcgagggcga gggcgatgcc 180
 25 acctacggca agctgaccct gaagttcatc tgcaccaccg gcaagctgcc cgtgccctgg 240
 cccaccctcg tgaccaccct gacctacggc gtgcagtgtc tcagccgcta ccccgaccac 300
 30 atgaagcagc acgacttctt caagtccgcc atgcccgaag gctacgtcca ggagcgcacc 360
 atcttcttca aggacgacgg caactacaag acccgcgccg aggtgaagtt cgagggcgac 420
 accctggtga accgcatcga gctgaagggc atcgacttca aggaggacgg caacatcctg 480
 35 gggcacaagc tggagtacaa ctacaacagc cacaacgtct atatcatggc cgacaagcag 540
 aagaacggca tcaaggtgaa cttcaagatc cgccacaaca tcgaggacgg cagcgtgcag 600
 40 ctcgccgacc actaccagca gaacaccccc atcggcgacg gccccgtgct gctgcccgac 660
 aaccactacc tgagcaccca gtccgcctg agcaaagacc ccaacgagaa gcgcgatcac 720
 45 atggtcctgc tggagtctgt gaccgcccgc gggatcactc tcggcatgga cgagctgtac 780
 aagtaa 786
 <210> 2
 50 <211> 260
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 55 <223> Proteína GFP-STOP
 <400> 2
 60 Met Gly Arg Gly Ser His His His His His His Lys Leu Pro Lys Lys
 1 5 10 15
 Lys Arg Lys Val Leu Glu Met Val Ser Lys Gly Glu Leu Phe Thr Gly
 20 25 30
 65 Val Val Pro Ile Leu Val Glu Leu Asp Gly Asp Val Asn Gly His Lys
 35 40 45

ES 2 536 640 T3

5 Phe Ser Val Ser Gly Glu Gly Glu Gly Asp Ala Thr Tyr Gly Lys Leu
 50 55 60
 Thr Leu Lys Phe Ile Cys Thr Thr Gly Lys Leu Pro Val Pro Trp Pro
 65 70 75 80
 10 Thr Leu Val Thr Thr Leu Thr Tyr Gly Val Gln Cys Phe Ser Arg Tyr
 85 90 95
 15 Pro Asp His Met Lys Gln His Asp Phe Phe Lys Ser Ala Met Pro Glu
 100 105 110
 20 Gly Tyr Val Gln Glu Arg Thr Ile Phe Phe Lys Asp Asp Gly Asn Tyr
 115 120 125
 25 Lys Thr Arg Ala Glu Val Lys Phe Glu Gly Asp Thr Leu Val Asn Arg
 130 135 140
 30 Ile Glu Leu Lys Gly Ile Asp Phe Lys Glu Asp Gly Asn Ile Leu Gly
 145 150 155 160
 35 His Lys Leu Glu Tyr Asn Tyr Asn Ser His Asn Val Tyr Ile Met Ala
 165 170 175
 40 Asp Lys Gln Lys Asn Gly Ile Lys Val Asn Phe Lys Ile Arg His Asn
 180 185 190
 45 Ile Glu Asp Gly Ser Val Gln Leu Ala Asp His Tyr Gln Gln Asn Thr
 195 200 205
 50 Pro Ile Gly Asp Gly Pro Val Leu Leu Pro Asp Asn His Tyr Leu Ser
 210 215 220
 55 Thr Gln Ser Ala Leu Ser Lys Asp Pro Asn Glu Lys Arg Asp His Met
 225 230 235 240
 60 Val Leu Leu Glu Phe Val Thr Ala Ala Gly Ile Thr Leu Gly Met Asp
 245 250 255
 65 Glu Leu Tyr Lys
 260
 <210> 3
 <211> 25
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> oligonucleótido
 <400> 3
 gttctcgaga tggtagcaa ggct

5 <210> 4
 <211> 25
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

10 <220>
 <223> oligonucleótido

<400> 4
 gcaccacccc ggtgaacagc tccta 25

15 <210> 5
 <211> 25
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

20 <220>
 <223> oligonucleótido

<400> 5
 gttctcgaga tggtagcaa gggcg 25

25

30 <210> 6
 <211> 25
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

<220>
 <223> oligonucleótido

35 <400> 6
 gcaccacccc ggtgaacagc tcctc 25

40 <210> 7
 <211> 25
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

45 <220>
 <223> oligonucleótido

<400> 7
 catgcatgca tgcattgatg catgc 25

50

55 <210> 8
 <211> 25
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

<220>
 <223> oligonucleótido

60 <400> 8
 tgagggtgaa ggtgatgcta cttac 25

65 <210> 9
 <211> 25
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

<220>

ES 2 536 640 T3

<223> oligonucleótido
 <400> 9
 5 gatgaactta agtgtaagtt taccg 25

 <210> 10
 <211> 25
 <212> ADN
 10 <213> Secuencia Artificial

 <220>
 <223> oligonucleótido
 15 <400> 10
 tgagggtgaa ggtgatgcta cttac 25

 <210> 11
 <211> 25
 <212> ADN
 20 <213> Secuencia Artificial

 <220>
 <223> oligonucleótido
 25 <400> 11
 gatgaactta agtgtaagtt taccg 25

 <210> 12
 <211> 786
 <212> ADN
 30 <213> Secuencia Artificial

 <220>
 <223> YFP-STOP
 35 <400> 12
 40 atgggaagag gatcgcatca ccaccatcat cataagcttc caaagaagaa gaggaaggtt 60
 ctcgagatgg tttctaaggg tgaggaactt ttcactggtg tggttccaat tctcgttgag 120
 cttgatggtg atgttaacgg acacaagttc tctgtttctg gtgaaggatga aggtgatgct 180
 45 acttaaggaa agcttactct caagttcatc tgcactactg gaaagcttcc agttccatgg 240
 ccaactcttg ttactacttt cggatacggg gttcaatgct tcgctaggta tccagatcat 300
 50 atgaggcagc acgatttctt caagtctgct atgccagagg gatatggttca agagaggact 360
 atcttcttca aggatgatgg caactacaag actagggctg aggttaagtt cgagggtgat 420
 actcttgtga acaggattga gcttaagggc atcgatttca aagaggatgg aaacattctc 480
 55 ggccacaagc ttgagtacaa ctacaattct cacaacgtgt acatcatggc tgataagcag 540
 aagaacggca tcaagggttaa cttcaagatc aggcacaaca tcgaggatgg atctgttcaa 600
 60 cttgctgatc attaccagca gaacactcca attggagatg gaccagttct tcttcctgat 660
 aaccactacc tttcttaccg gtctgctctt tccaaggatc caaatgagaa gagggatcac 720
 atggtgcttt tggagtttgt tactgctgct ggaatcactc ttggcatgga tgaactctac 780
 65 aagtga 786

ES 2 536 640 T3

<210> 13
 <211> 261
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial
 5
 <220>
 <223> YFP-STOP
 <400> 13
 10 Met Gly Arg Gly Ser His His His His His His Lys Leu Pro Lys Lys
 1 5 10 15
 15 Lys Arg Lys Val Tyr Leu Glu Met Val Ser Lys Gly Glu Glu Leu Phe
 20 25 30
 20 Thr Gly Val Val Pro Ile Leu Val Glu Leu Asp Gly Asp Val Asn Gly
 35 40 45
 25 His Lys Phe Ser Val Ser Gly Glu Gly Glu Gly Asp Ala Thr Gly Lys
 50 55 60
 30 Leu Thr Leu Lys Phe Ile Cys Thr Thr Gly Lys Leu Pro Val Pro Trp
 65 70 75 80
 35 Pro Thr Leu Val Thr Thr Phe Gly Tyr Gly Val Gln Cys Phe Ala Arg
 85 90 95
 40 Tyr Pro Asp His Met Arg Gln His Asp Phe Phe Lys Ser Ala Met Pro
 100 105 110
 45 Glu Gly Tyr Val Gln Glu Arg Thr Ile Phe Phe Lys Asp Asp Gly Asn
 115 120 125
 50 Tyr Lys Thr Arg Ala Glu Val Lys Phe Glu Gly Asp Thr Leu Val Asn
 130 135 140
 55 Arg Ile Glu Leu Lys Gly Ile Asp Phe Lys Glu Asp Gly Asn Ile Leu
 145 150 155 160
 60 Gly His Lys Leu Glu Tyr Asn Tyr Asn Ser His Asn Val Tyr Ile Met
 165 170 175
 65 Ala Asp Lys Gln Lys Asn Gly Ile Lys Val Asn Phe Lys Ile Arg His
 180 185 190
 70 Asn Ile Glu Asp Gly Ser Val Gln Leu Ala Asp His Tyr Gln Gln Asn
 195 200 205
 75 Thr Pro Ile Gly Asp Gly Pro Val Leu Leu Pro Asp Asn His Tyr Leu
 210 215 220
 80 Ser Tyr Gln Ser Ala Leu Ser Lys Asp Pro Asn Glu Lys Arg Asp His
 225 230 235 240

ES 2 536 640 T3

Met Val Leu Leu Glu Phe Val Thr Ala Ala Gly Ile Thr Leu Gly Met
245 250 255

5

Asp Glu Leu Tyr Lys
260

10

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 al menos un primer oligonucleótido y un segundo oligonucleótido,
 en el que el primer oligonucleótido comprende al menos un dominio que es capaz de hibridarse a la primera secuencia de ADN y en el que el primer oligonucleótido comprende además al menos un desapareamiento con respecto a la
 10 primera secuencia de ADN y en el que dicho al menos un desapareamiento se encuentra como máximo 2 nucleótidos del extremo 3' de dicho primer oligonucleótido;
 y en el que el segundo oligonucleótido comprende al menos un dominio que es capaz de hibridarse a la segunda secuencia de ADN y en el que el segundo oligonucleótido comprende además al menos un desapareamiento con
 15 respecto a la segunda secuencia de ADN y en el que dicho al menos un desapareamiento se encuentra como máximo 2 nucleótidos del extremo 3' de dicho segundo oligonucleótido;
 y en el que dicho al menos un desapareamiento en el primer oligonucleótido es relativo a un nucleótido en la primera secuencia de ADN de la secuencia de ADN aceptor de doble cadena y en el que dicho al menos un desapareamiento en el
 20 segundo oligonucleótido es relativo a un nucleótido en la segunda secuencia de ADN del ADN aceptor de doble cadena, y en el que dichos nucleótidos ocupan posiciones complementarias en el ADN aceptor de doble cadena, 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 desapareamiento en el primer oligonucleótido o el desapareamiento en el segundo oligonucleótido se encuentra, independientemente, como máximo 1 nucleótido del
 25 extremo 3' de dicho oligonucleótido, más preferiblemente dicho al menos un desapareamiento está en el extremo 3' del oligonucleótido, preferiblemente el desapareamiento en ambos oligonucleótidos está en el extremo 3' de los oligonucleótidos.
3. Procedimiento, según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que el dominio en el primer oligonucleótido y/o en el segundo oligonucleótido comprende o está directamente adyacente a dicho al menos un desapareamiento.
4. Procedimiento, según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que el primer oligonucleótido es complementario a la primera secuencia de ADN a excepción del desapareamiento y/o en el que el segundo oligonucleótido es complementario a la segunda secuencia de ADN a excepción del desapareamiento.
5. Procedimiento, según la reivindicación 4, en el que el desapareamiento en el primer oligonucleótido está en el extremo 3' y en el que el desapareamiento en el segundo oligonucleótido está en el extremo 3'.
6. Procedimiento, según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que el primer oligonucleótido y/o el segundo oligonucleótido comprende al menos una sección que contiene al menos un nucleótido modificado, en el que la modificación se selecciona del grupo que consiste en una modificación de bases, una modificación de bases en el
 40 extremo 3' y/o 5', una modificación del esqueleto o una modificación de azúcares.
7. Procedimiento, según la reivindicación 6, en el que el nucleótido modificado se selecciona del grupo que consiste en LNA o enlaces fosforotioato.
8. Procedimiento, según cualquiera de las reivindicaciones 6-7, en el que el oligonucleótido comprende al menos dos, tres, cuatro o cinco nucleótidos modificados, preferiblemente el oligonucleótido comprende dos, tres, cuatro o cinco nucleótidos modificados.
9. Procedimiento, según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que el desapareamiento no es un nucleótido modificado.
10. Procedimiento, según cualquiera de las reivindicaciones 6-9, 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 el extremo 3' del oligonucleótido.
11. 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.
12. 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.

13. 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.
- 5 14. Procedimiento, según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que el ADN aceptor de doble cadena es de ADN genómico, ADN lineal, cromosomas artificiales, cromosomas artificiales de mamífero, cromosomas artificiales de bacterias, cromosomas artificiales de levadura, cromosomas artificiales de planta, ADN cromosómico nuclear, ADN de orgánulos, y/o ADN episomal, incluyendo plásmidos.
- 10 15. 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 codificante, para modificar una proteína mediante la alteración de la región codificante.
- 15 16. 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
 combinar la secuencia de ADN aceptor de doble cadena con al menos un primer oligonucleótido y un segundo oligonucleótido,
 20 en el que el primer oligonucleótido comprende al menos un dominio que es capaz de hibridarse a la primera secuencia de ADN y en el que el primer oligonucleótido comprende además 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 del extremo 3' de dicho primer oligonucleótido;
 y en el que el segundo oligonucleótido comprende al menos un dominio que es capaz de hibridarse a la segunda
 25 secuencia de ADN y en el que el segundo oligonucleótido comprende además al menos un desapareamiento con respecto a la segunda secuencia de ADN y en el que dicho al menos un desapareamiento se encuentra como máximo 2 nucleótidos del extremo 3' de dicho segundo oligonucleótido;
 y en el que dicho al menos un desapareamiento en el primer oligonucleótido es relativo a un nucleótido en la primera
 30 secuencia de ADN de la secuencia de ADN aceptor de doble cadena y en el que dicho al menos un desapareamiento en el segundo oligonucleótido es relativo a un nucleótido en la segunda secuencia de ADN del ADN aceptor de doble cadena, y en el que dichos nucleótidos ocupan posiciones complementarias en el ADN aceptor de doble cadena, en el que el procedimiento no es para el tratamiento de un cuerpo humano o animal mediante terapia, en el que
 - 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
 35 consiste en una célula procariota, una célula bacteriana, una célula vegetal, una célula de levadura y una célula fúngica.
17. Utilización de al menos dos oligonucleótidos, tal como se describe en cualquiera de las reivindicaciones 1-15, para la alteración dirigida de una secuencia de ADN aceptor de doble cadena, preferiblemente, para alterar una célula, corregir
 40 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, en la que la utilización no es para el tratamiento de un cuerpo humano o animal
 45 mediante terapia.
18. Utilización de al menos dos oligonucleótidos, tal como se describe en cualquiera de las reivindicaciones 1-15, 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
 50 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, en la que
 - la utilización se realiza ex vivo; y/o
 55 - 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.
19. Kit que comprende instrucciones para realizar un procedimiento para la alteración dirigida de un ADN aceptor de
 60 doble cadena, según cualquiera de las reivindicaciones 1-15, que comprende además al menos dos oligonucleótidos para utilizar en el procedimiento, según cualquiera de las reivindicaciones 1-15, que comprende dichos al menos dos oligonucleótidos tal como se describe en cualquiera de las reivindicaciones 1-15.
20. Kit, según la reivindicación 19, en el que cuando se combina con una secuencia de ADN aceptor de doble cadena
 65 que contiene una primera secuencia de ADN y una segunda secuencia de ADN que es el complemento de la primera secuencia de ADN, el primer oligonucleótido comprende al menos un dominio que es capaz de hibridarse a la primera

5 secuencia de ADN y en el que el primer oligonucleótido comprende además 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 del extremo 3' de dicho primer oligonucleótido; y en el que el segundo oligonucleótido comprende al menos
un dominio que es capaz de hibridarse con la segunda secuencia de ADN y en el que el segundo oligonucleótido
comprende además al menos un desapareamiento con respecto a la segunda secuencia de ADN y en el que dicho al
menos un desapareamiento se encuentra como máximo 2 nucleótidos del extremo 3' de dicho segundo oligonucleótido;
y en el que dicho al menos un desapareamiento en el primer oligonucleótido es relativo a un nucleótido en la primera
10 secuencia de ADN de la secuencia de ADN aceptor de doble cadena y en el que dicho al menos un desapareamiento en
el segundo oligonucleótido es relativo a un nucleótido en la segunda secuencia de ADN del ADN aceptor de doble
cadena, y en el que dichos nucleótidos ocupan posiciones complementarias en el ADN aceptor de doble cadena

15

20

ES 2 536 640 T3

Figura 1

```
1   ATGGGAAGAG GATCGCATCA CCACCATCAT CATAAGCTTC CAAAGAAGAA GAGGAAGGT
60  TCTCGAGATG GTGAGCAAGG GCTAGGAGCT GTTCACCGGG GTGGTGCCCA TCCTGGTCG
120 AGCTGGACGG CGACGTAAAC GGCCACAAGT TCAGCGTGTC CGGCGAGGGC GAGGGCGAT
180 GCCACCTACG GCAAGCTGAC CCTGAAGTTC ATCTGCACCA CCGGCAAGCT 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 TACAAGATCC 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 (SEQ ID NO:1)
```

Figura 2

```
1   MGRGSHHHHH HKLPKKRKY LEMVSKG*EL FTGVVPILVE LDGDVNGHKF
51  SVSGEGEGDA TYGKLTLEFI CTTGKLPVPW PTLVTTLYG VQCFSRYPDH
101 MKQHDFFKSA MPEGYVQERT IFFKDDGNYK TRAEVKFEGD TLVNRIELKG
151 IDFKEDGNIL GHKLEYNYS HNVYIMADKQ KNGIKVNFKI RHNIEDGSVQ
201 LADHYQQNTP IGDGPVLLPD NHYLSTQSAL SKDPNEKRDH MVLLEFVTAA
251 GITLGMDELY K (SEQ ID NO:2)
```

Figura 3

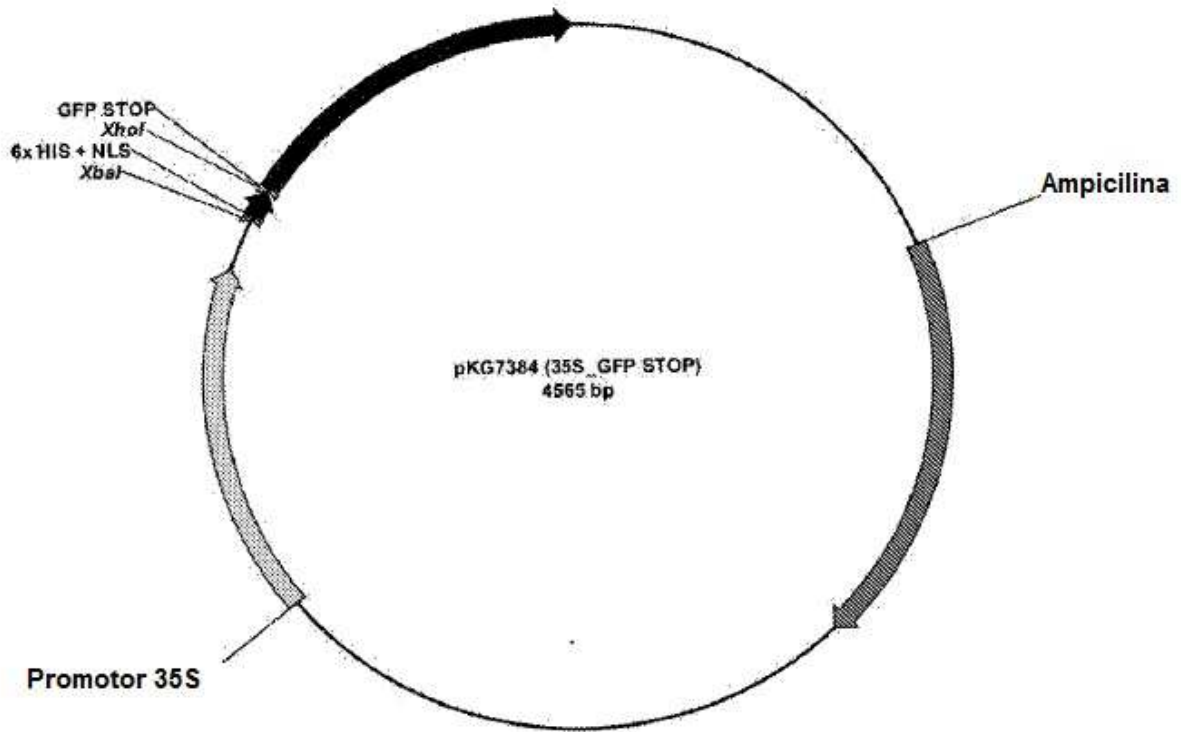


Figura 3 (continuación)

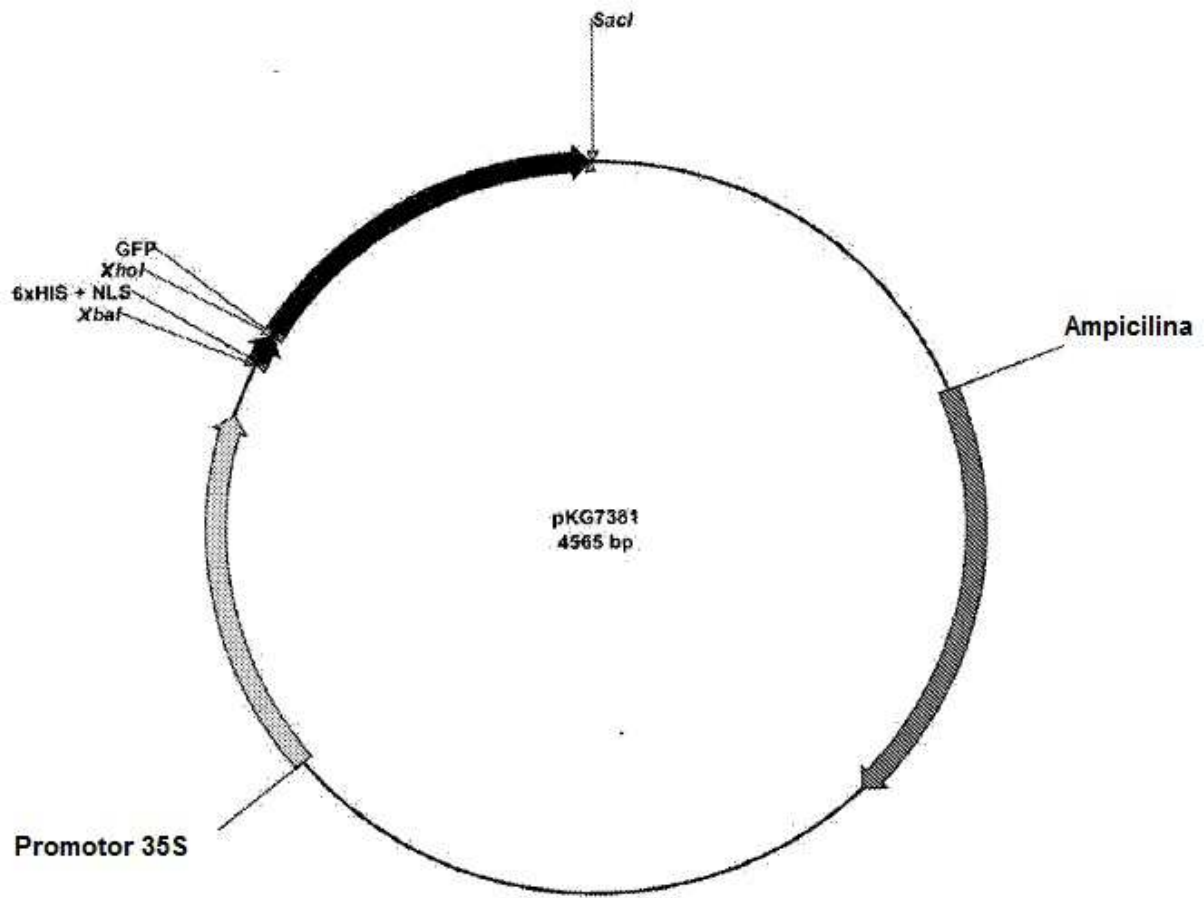


Figura 4

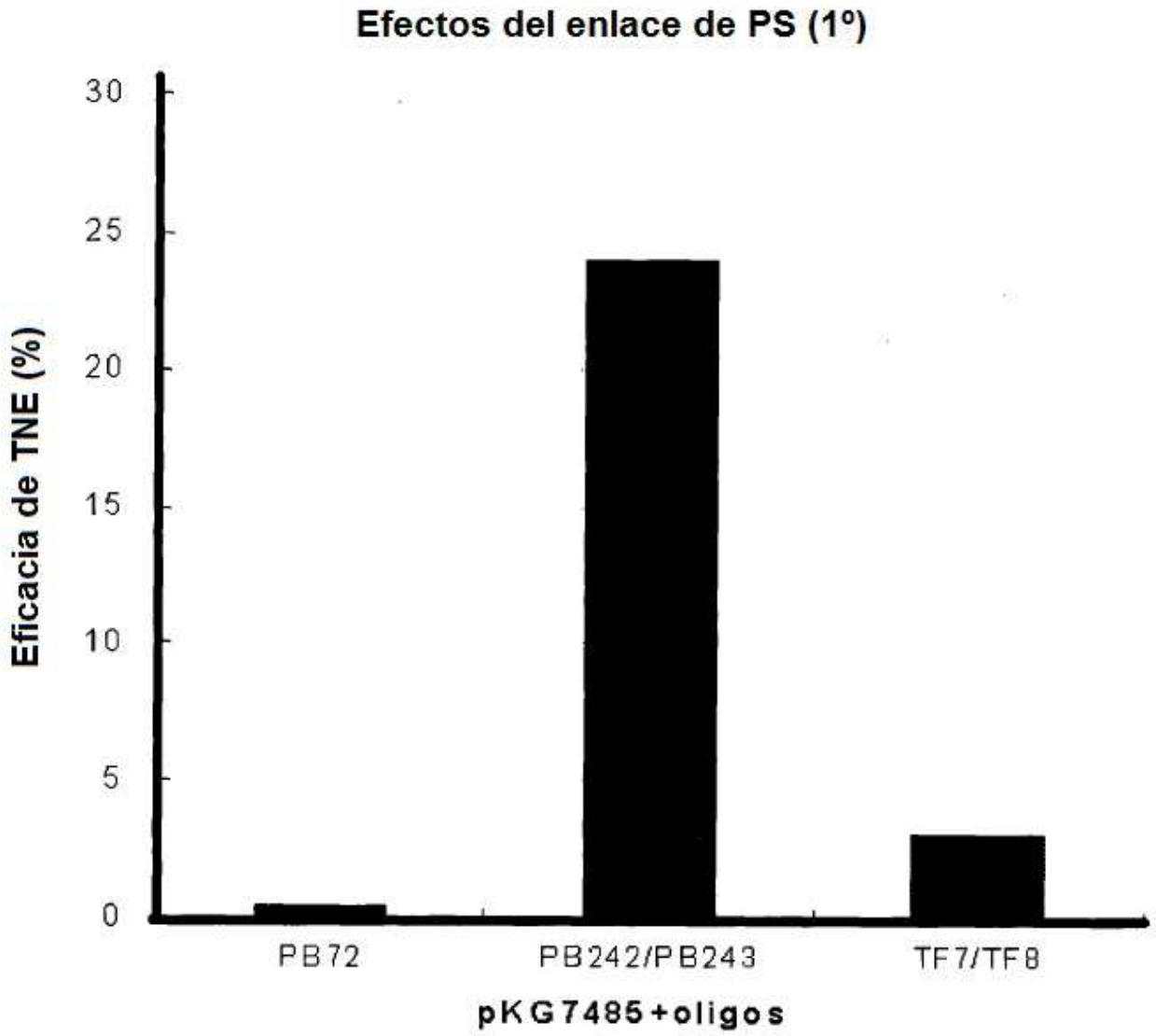


Figura 5

```

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 TGCCTACTG GAAAGCTTCC AGTTCATGG 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    TCAAGGTTAA CTTCAAGATC AGGCACAACA TCGAGGATGG ATCTGTTCAA
601    CTTGCTGATC ATTACCAGCA GAACACTCCA ATTGGAGATG GACCAGTTCT
651    TCTTCCTGAT AACCCTACC TTTCTTACCA GTCTGCTCTT TCCAAGGATC
701    CAAATGAGAA GAGGGATCAC ATGGTGCTTT TGGAGTTTGT TACTGCTGCT
751    GGAATCACTC TTGGCATGGA TGAACCTAC AAGTGA

```

Figura 6

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