

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 588 482**

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 14195788 (6)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **29.06.2016 EP 2857512**

54 Título: **Alteración dirigida de ADN**

30 Prioridad:

**02.12.2010 US 419179 P**  
**03.12.2010 NL 2005808**

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:  
**03.11.2016**

73 Titular/es:

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

72 Inventor/es:

**LHUISSIER, FRANCK y**  
**BUNDOCK, PAUL**

74 Agente/Representante:

**PONTI SALES, Adelaida**

**ES 2 588 482 T3**

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

## DESCRIPCIÓN

Alteración dirigida de ADN

## 5 Campo técnico

**[0001]** La presente invención se refiere a un procedimiento para la alteración dirigida de ADN aceptor, por ejemplo, ADN de doble cadena aceptor. El procedimiento comprende el uso de un oligonucleótido que tiene al menos un desapareamiento con respecto al ADN aceptor diana (doble cadena). El desapareamiento se localiza en 10 posiciones específicas dentro de dicho oligonucleótido. También se describe un kit que comprende instrucciones para llevar a cabo el procedimiento según las invenciones, y en una realización preferida, comprende un oligonucleótido adecuado para su uso en el procedimiento.

## Antecedentes de la invención

15 **[0002]** La modificación genética en el proceso de creación deliberada de cambios en el material genético de células vivas. A menudo, el objetivo es modificar una propiedad biológica codificada genéticamente de dicha célula, o del organismo del que forma parte la célula o dentro del cual puede regenerarse. Estos cambios pueden tomar la forma de delección de partes del material genético, adición de material genético exógeno o cambios en la secuencia de nucleótidos existentes, por ejemplo, sustituyendo un nucleótido por otro.

20 **[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 en microorganismos para obtener mejoras en los campos de la agricultura, la salud humana, la calidad alimentaria y la 25 protección ambiental.

**[0004]** Una metodología de modificación genética frecuente consiste en la adición de fragmentos de ADN exógeno al genoma de una célula, lo que puede entonces conferir una nueva propiedad a esa célula o a su organismo por encima de las propiedades codificadas por los genes ya existentes (incluidas aplicaciones en las que 30 se suprimirá de este modo la expresión de los genes existentes).

**[0005]** Aunque estos procedimientos pueden tener cierta eficacia proporcionando las propiedades deseadas a una diana, no obstante, dichos procedimientos no son muy precisos. No existe, por ejemplo, control sobre las 35 posiciones genómicas en las que se insertan los fragmentos de ADN exógeno (y, por tanto, sobre los niveles finales de expresión). Además, el efecto deseado se manifestará por sí mismo sobre las propiedades naturales codificadas por el genoma original y bien equilibrado. Por el contrario, los procedimientos de alteración genética que darán lugar a la adición, delección o conversión de nucleótidos en loci genómicos predefinidos permitirán la modificación precisa y controlable de los genes existentes.

40 **[0006]** El intercambio dirigido de nucleótidos (IDN) por oligonucleótidos es un procedimiento que se basa en la administración a la célula eucariota de oligonucleótidos (sintéticos) (moléculas compuestas por tramos cortos de nucleótidos y/o restos similares a nucleótidos que recuerdan al ADN en sus propiedades de apareamiento de bases de Watson y Crick, pero que pueden ser químicamente diferentes al ADN; [Alexeev y Yoon, 1998]; [Rice y col., 2001]; [Kmiec, 2003])

45 **[0007]** Mediante el diseño deliberado de un nucleótido desapareado en la secuencia homóloga del oligonucleótido, el nucleótido desapareado puede inducir cambios en la secuencia de ADN genómica con el que puede hibridar dicho nucleótido. Este procedimiento permite la conversión de uno o más nucleótidos en la diana, y puede, por ejemplo, aplicarse a la creación de codones de parada en genes existentes, lo que tiene como resultado 50 la interrupción de su función, o para crear cambios de codones, que hacen que los genes codifiquen proteínas con la composición de aminoácidos alterada (ingeniería de proteínas).

**[0008]** El intercambio dirigido de nucleótidos (IDN) se ha descrito en muchos organismos incluidas células vegetales, animales y de levaduras, denominándose también mutagénesis dirigida por oligonucleótido (MDO).

55 **[0009]** Los primeros ejemplos de IDN usando oligonucleótidos de ADN:ARN quiméricos procedían de células animales (revisado en [Igoucheva y col., 2001]). También se ha demostrado el IDN usando oligonucleótidos de ADN:ARN quiméricos en células vegetales (Beetham y col., 1999; Kochevenko y Willmitzer, 2003; Okuzaki y Toriyama, 2004; Zhu y col., 2000; Zhu y col., 1999) En general, las frecuencias documentadas en estudios tanto en

plantas como en animales eran demasiado bajas para la aplicación práctica de IDN en loci cromosómicos no seleccionables. También se ha encontrado que el IDN usando oligonucleótidos quiméricos era difícil de reproducir (Riuter y col., 2003), lo que ha dado lugar a una búsqueda de diseños de oligonucleótidos alternativos que proporcionen resultados más fiables.

5

**[0010]** Varios laboratorios se han centrado en el uso de oligonucleótidos de cadena sencilla (cs) para el IDN. Se ha encontrado que estos proporcionan resultados más reproducibles tanto en células vegetales como animales (Liu y col., 2002) (Parekh-Olmedo y col., 2005) (Dong y col., 2006). No obstante, el problema principal con el que se enfrenta la aplicación del IDN en células, en especial, de organismos superiores como las plantas, sigue siendo la

10 baja eficacia relativa que se ha notificado hasta el momento. En maíz se ha documentado una frecuencia de conversión de  $1 \times 10^{-4}$  (Zhu y col., 2000). En estudios posteriores en tabaco (Kochevko y Willmitzer, 2003) y en arroz (Okuzaki y Toriyama, 2004) se han documentado frecuencias de  $1 \times 10^{-6}$  y  $1 \times 10^{-4}$ , respectivamente.

**[0011]** El IDN utilizando diversos tipos de oligonucleótidos ha sido el objeto de diversas patentes y solicitudes

15 de patentes, incluidos los documentos US6936467, US7226785, US579597, US6136601, US2003/0163849, US2003/0236208, WO03/013226, US5594121 y WO01/92512.

**[0012]** En el documento US6936467 se contempla que la baja eficiencia de alteración génica obtenida usando oligonucleótidos de ADN no modificados es el resultado de la degradación de los oligonucleótidos donadores

20 por las nucleasas presentes en la mezcla de reacción o en la célula diana. Se propone incorporar nucleótidos modificados que hagan a los oligonucleótidos resultantes (más) resistentes a las nucleasas. Se describe que estas modificaciones están preferiblemente localizadas en los extremos del oligonucleótido mientras que el desapareamiento se presenta al menos a 8 nucleótidos de distancia de cada extremo terminal.

**[0013]** En el documento US7226785 también se describen procedimientos para realizar alteraciones genómicas cromosómicas dirigidas usando oligonucleótidos de cadena sencilla modificados con al menos una

25 región terminal resistente a nucleasas modificada. El IDN usando oligonucleótidos de cadena sencilla modificados también es el objeto del documento WO02/26967.

**[0014]** Debido a la baja eficiencia de los procedimientos actuales de IDN, sigue existiendo la necesidad de técnicas de IDN alternativas y/o mejores. Estas pueden usarse solas o en combinación con técnicas de IDN

30 existentes, como las descritas anteriormente o en la técnica, para aumentar su eficiencia. Por consiguiente, los presentes inventores se han propuesto mejorar la tecnología de IDN existente.

## 35 **Resumen de la invención**

### **Problema técnico**

**[0015]** El problema técnico identificado en la técnica es que la metodología disponible en la actualidad para

40 introducir cambios genéticos específicos y deseados en las células, por ejemplo para introducir cambios genéticos específicos en el genoma presente en una célula vegetal, se ve obstaculizado por la baja eficiencia, lo que hace que las técnicas sean laboriosas y costosas. Existe la necesidad de encontrar técnicas de IDN alternativas y mejores.

**[0016]** Uno de los problemas que hay que resolver es, por tanto, proporcionar un procedimiento alternativo

45 y/o mejor y/o adicional para la introducción de cambios genéticos en la información genética, tales como secuencias de ADN de doble cadena, como las que se presentan en las células. Preferiblemente, dicho procedimiento tiene una eficiencia mejorada en comparación con aquellos descritos en la técnica. Este procedimiento podría permitir el suministro a las células de información genética alterada, más en especial, en células donde se ha cambiado una

50 funcionalidad de la célula mediante la introducción de la alteración en el ADN diana. Dicha funcionalidad puede estar relacionada, por ejemplo, con 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 del problema**

**[0017]** Los inventores han encontrado un nuevo procedimiento para la alteración dirigida de una secuencia de

55 ADN de doble cadena. El procedimiento utiliza un oligonucleótido donador que comprende un dominio que es capaz de hibridar con la diana (en condiciones que permitan la hibridación, según conocen los expertos en la materia). El nucleótido donador además comprende al menos un desapareamiento en comparación con la secuencia de ADN doble cadena dirigida, dicho desapareamiento debe introducirse en la secuencia de ADN doble cadena dirigida.

**[0018]** Mientras que en la técnica se postula y es de conocimiento común que el desapareamiento debe ría estar presente en el oligonucleótido, en otras palabras "en algún lugar en mitad" del oligonucleótido (véanse, por ejemplo, las diversas solicitudes de patente descritas anteriormente, en especial los documentos US6936467 y 5 US7226785), ahora se ha encontrado sorprendente e inesperadamente que puede realizarse el IDN con buena eficiencia cuando el desapareamiento no está localizado en algún lugar en mitad del oligonucleótido sino en localizaciones específicas. En especial se ha encontrado que para un IDN eficiente, el desapareamiento se localiza a lo sumo a dos, preferiblemente a lo sumo a un nucleótido del extremo 3' del oligonucleótido. Más preferiblemente, el al menos un desapareamiento está en el extremo 3' del oligonucleótido (cs).

10 **[0019]** En contraste con la creencia general de que cualquier desapareamiento debería estar en la parte central del oligonucleótido y que, por ejemplo, deberían introducirse modificaciones en el extremo 5' y en el extremo 3' del oligonucleótido para evitar la degradación prematura del oligonucleótido por las nucleasas (véase, por ejemplo, el documento US6936467), ahora se ha encontrado que si se tiene un desapareamiento en el oligonucleótido a cero, 15 uno o a lo sumo dos nucleótidos del extremo 3' se proporciona un oligonucleótido que puede usarse de forma ventajosa en procedimientos de intercambio dirigido de nucleótidos, es decir, en procedimientos para la alteración dirigida de una secuencia de ADN doble.

**[0020]** Además, el oligonucleótido que comprende el al menos un desapareamiento a cero, uno o a lo sumo 20 dos nucleótidos del extremo 3' puede además modificarse mediante la inclusión de nucleótidos modificados; es decir, nucleótidos que tengan una modificación de base, una modificación del esqueleto, una modificación de un 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 del oligonucleótido con la secuencia diana y/o 25 prevenir o inhibir la degradación del oligonucleótido mediante las denominadas nucleasas. Entre los ejemplos de dichos nucleótidos modificados se incluyen ácidos nucleicos bloqueados o nucleótidos con enlaces fosforotioato. No obstante, como se muestra en el ejemplo 3, no requiere que el oligonucleótido incorpore nucleótidos con enlaces fosforotioato ni se requiere que el oligonucleótido incorpore cualquier otro tipo de nucleótido modificado.

### Breve descripción de los dibujos

30 **[0021]**

En la figura 1 se muestra la secuencia de nucleótidos del marco abierto de lectura (ORF, por sus siglas en inglés) de GFP que contiene un codon de parada (SEC ID N.º 1).

35 En la figura 2 se muestra la secuencia de aminoácidos de la proteína GFP-STOP, con la posición del codon de parada representada por el asterisco (SEC ID N.º 2).

40 La figura 3 es una visión general esquemática de las construcciones utilizadas en este estudio.

En la figura 4 se muestra la reparación de GFP episomal mediante diferentes oligonucleótidos, probados en al menos tres experimentos independientes.

45 En la figura 5 se muestra la secuencia de nucleótidos de la construcción YFP-STOP. El nucleótido de la posición 186 ha sido alterado (C por A), lo que tiene como resultado un codon de parada en marco (SEC ID N.º 3).

En la figura 6 se muestra la secuencia de YFP-STOP. La posición del codon de parada en la proteína está indicada mediante un asterisco (SEC ID N.º 4).

50 En la figura 7 se muestra el IDN sobre el plásmido YFP episomal en protoplastos de tomate. El número 7460 muestra la eficiencia de transformación utilizando solo el gen YFP natural. 7461+PB212 indica la eficiencia de reparación cuando la construcción YFP-STOP 35S se introdujo conjuntamente en protoplastos de tomate junto con el oligonucleótido PB212.

55 En la figura 8 se muestra que un oligonucleótido según la invención, incluso sin ninguna modificación como enlace PS, aumenta la eficiencia de IDN.

### Definiciones

**[0022]** En la descripción y en los ejemplos siguientes se usan varios términos. Para proporcionar una comprensión clara y coherente de la memoria descriptiva y de las reivindicaciones, incluyendo el alcance que se da a estos términos, se proporcionan las siguientes definiciones. Siempre que no se defina otra cosa en este documento, todos los términos técnicos y científicos usados tienen el mismo significado que normalmente entiende un experto en la materia a la que pertenece esta invención. Las descripciones de todas las publicaciones, las solicitudes de patentes, patentes y otras referencias se incorporan a este documento en su integridad por referencia.

**[0023]** Según se usa en este documento, las formas singulares «un/una» y «el/la» incluyen los referentes plurales siempre que el contexto no dicte claramente otra cosa. Por ejemplo, un procedimiento para aislar «una» molécula de ADN como se usó anteriormente, incluye aislar una gran variedad de moléculas (p. ej., 10, 100, 1000, 10 000, 100 000, millones o más moléculas).

**[0024]** Los procedimientos de realización de las técnicas convencionales utilizadas en procedimientos de la invención serán evidentes para los expertos. La práctica de las técnicas convencionales en biología molecular, bioquímica, química computacional, cultivo celular, ADN recombinante, bioinformática, genómica, secuenciación y campos relacionados es bien conocida por los expertos en la materia y se discute, por ejemplo, en las siguientes referencias bibliográficas: Sambrook y col., *Molecular Cloning. A Laboratory Manual*, 2.<sup>a</sup> Edición, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N. Y., 1989; Ausubel y col., *Current Protocols in Molecular Biology*, John Wiley & Sons, Nueva York, 1987 y actualizaciones periódicas; y la serie *Methods in Enzymology*, Academic Press, San Diego.

**[0025]** 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*, pág. 793-800 [Worth Pub. 1982] que se incorpora a este documento por referencia en su totalidad para todos los fines). La presente invención contempla cualquier componente ácido nucleico de desoxirribonucleótidos, ribonucleótidos o péptidos, y cualquier variante química de los mismos, tales como formas metiladas, hidroximetiladas o glucosiladas de estas bases, y similares. Los polímeros u oligómeros pueden ser heterogéneos u homogéneos en cuanto a composición, y pueden aislarse a partir de fuentes naturales o pueden producirse de forma artificial o sintética. Además, los ácidos nucleicos pueden ser ADN o ARN, o una mezcla de ambos, y pueden existir permanente o transitoriamente en forma de cadena sencilla o doble cadena, como homodúplex, heterodúplex y estados híbridos.

**[0026]** Oligonucleótido (sintético): las molécula de ADN de cadena sencilla que tienen preferiblemente de aproximadamente 5 a aproximadamente 150 bases y que se pueden sintetizar químicamente se denominan oligonucleótidos sintéticos. En general, estas moléculas de ADN sintéticas están diseñadas para tener una secuencia nucleotídica única o deseada, aunque es posible sintetizar familias de moléculas con secuencias relacionadas y que tienen diferentes composiciones de nucleótidos en posiciones específicas dentro de la secuencia nucleotídica. El término oligonucleótido sintético se usará para hacer referencia a moléculas de ADN que tienen una secuencia nucleotídica diseñada o deseada. «Intercambio dirigido de nucleótidos» o «IDN». El intercambio dirigido de nucleótidos (IDN) es un proceso mediante el cual un oligonucleótido sintético, al menos parcialmente complementario a un sitio en un cromosoma o en un gen episomal dirige el cambio de sentido de un nucleótido en un sitio específico. El IDN se ha descrito empleando una amplia variedad de oligonucleótidos y dianas. Algunos de los nucleótidos descritos son quimeras ARN/ADN y contienen modificaciones terminales para impartir resistencia a nucleasas.

#### 45 **Descripción de las realizaciones**

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

**[0028]** El procedimiento comprende combinar una/la secuencia de ADN de doble cadena aceptora con un oligonucleótido donador. El oligonucleótido comprende un dominio que es capaz de hibridar con la primera secuencia de ADN (en condiciones que permitan la hibridación, como conocen los expertos en la materia). El dominio que es capaz de hibridar con la primera secuencia de ADN comprende al menos un desapareamiento con respecto a la primera secuencia de ADN. Dicho al menos un desapareamiento está ubicado a lo sumo a 2, preferiblemente a lo sumo a 1 nucleótido del extremo 3' de dicho oligonucleótido. Más preferiblemente, dicho al menos un desapareamiento está en el extremo 3' del oligonucleótido.

**[0029]** El procedimiento según la invención permite la alteración específica y selectiva de uno o más

nucleótidos en (un) sitio(s) específico(s) de una secuencia de ADN aceptora por medio de oligonucleótidos. En particular, la alteración dirigida se puede realizar dentro de una célula diana que contenga la secuencia de ADN doble aceptora mediante la introducción dentro de esa célula de un oligonucleótido según la invención, es decir, teniendo, en comparación con la primera secuencia de ADN, al menos un desapareamiento y en el que dicho al menos un desapareamiento está ubicado a lo sumo a 2, preferiblemente a lo sumo a 1 nucleótido del extremo 3' de dicho oligonucleótido. Más preferiblemente, dicho al menos un desapareamiento está en el extremo 3' del oligonucleótido. El resultado del procedimiento es la alteración dirigida de uno o más nucleótidos, de modo que la secuencia de la secuencia de ADN diana se altera. La invención puede realizarse preferiblemente *in vivo*, pero también se puede realizar *ex vivo* o *in vitro*.

10

**[0030]** Dentro del 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 la complementaria de la primera secuencia de ADN y se empareja con ella para formar la doble cadena. Por ejemplo, una secuencia complementaria de una primera secuencia de ADN ATTT (en sentido 5' a 3') es TAAA (en sentido 3' a 5'). Esta segunda secuencia de ADN se empareja con 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 estar en la cadena sentido o en la cadena complementaria.

**[0031]** El ADN de la secuencia de ADN de doble cadena puede ser cualquier tipo de ADN, como ADN genómico, ADN derivado de ADN genómico, ADN lineal, cromosomas artificiales, ADN cromosómico nuclear, ADN de orgánulos, cromosomas artificiales bacterianos (BAC), cromosomas artificiales de levaduras (YAC), ADN plasmídico, ADN episomal. La secuencia de ADN puede ser parte de un intrón o un exón, codificante o no codificante, reguladora de la expresión o no.

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

30

**[0033]** El al menos un dominio puede, por tanto, comprender al menos un desapareamiento con respecto a la secuencia de ADN de doble cadena que se va a alterar o está directamente junto/adyacente al desapareamiento. En otras palabras, el oligonucleótido comprende un dominio que consta de nucleótidos adyacentes que pueden hibridar, en las condiciones del experimento, con la primera secuencia de ADN de la secuencia de ADN de doble cadena aceptora, y comprende un desapareamiento con respecto a dicha primera secuencia de ADN o el desapareamiento está ubicado directamente junto a dicho dominio (y en el que el desapareamiento está ubicado a 0, 1 o 2 nucleótidos del extremo 3' del oligonucleótido).

**[0034]** Por ejemplo, si el dominio está (en sentido 5' a 3') ubicado hasta a 3 nucleótidos del extremo 3', el desapareamiento puede estar directamente junto al dominio a 2 nucleótidos del extremo 3' del oligonucleótido.

**[0035]** Por ejemplo, si el dominio está (en sentido 5' a 3') ubicado hasta a 1 nucleótido del extremo 3', el desapareamiento puede estar comprendido en el dominio, por ejemplo, localizado a 2 nucleótidos del extremo 3', o estar directamente adyacente al dominio, es decir, localizado a 0 nucleótidos del extremo 3', en otras palabras, en el extremo 3' del oligonucleótido.

**[0036]** El experto en la materia entenderá que dentro del contexto de la presente invención, y donde se hace referencia al desapareamiento o el desapareamiento comprendido en el dominio que es capaz de hibridar con la primera secuencia de ADN, estos incluyen cualquier desapareamiento comprendido en el dominio o ubicado directamente adyacente al dominio, siempre que el desapareamiento esté ubicado a 2, 1 o 0 nucleótidos del extremo 3' del oligonucleótido.

**[0037]** En determinadas realizaciones, el oligonucleótido comprende preferiblemente no más de un desapareamiento. En determinadas realizaciones se puede introducir más de una mutación en el ADN diana, simultáneamente o de forma sucesiva. El oligonucleótido puede albergar más de un desapareamiento en ubicaciones adyacentes o eliminadas del oligonucleótido. En determinadas realizaciones, el oligonucleótido puede comprender dos, tres, cuatro o más nucleótidos desapareados que pueden estar adyacentes o remotos (es decir, no adyacentes). El oligonucleótido puede comprender dominios adicionales para albergar esto. Los desapareamientos pueden estar en el mismo o en diferentes dominios.

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

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

**[0040]** Los oligonucleótidos que se usan como donadores en el procedimiento descrito en el presente documento pueden variar en longitud, aunque generalmente varían en longitud entre 10 y 500 nucleótidos, con una  
20 preferencia para 11 a 100 nucleótidos, preferiblemente de 15 a 90 nucleótidos, más preferiblemente de 20 a 70.

**[0041]** El dominio puede constar de al menos 5 nucleótidos, incluido el desapareamiento, pero también puede constar de todos los nucleótidos, incluido el desapareamiento, del oligonucleótido. En caso de que el desapareamiento esté directamente adyacente al dominio, el dominio puede constar de al menos 5 nucleótidos, pero  
25 también puede constar de todos los nucleótidos del oligonucleótido, excepto para el desapareamiento. Los dominios en el oligonucleótido son normalmente del orden de al menos 5, 10, preferiblemente 15, 20, 25 o 30 nucleótidos.

**[0042]** El oligonucleótido según la invención comprende al menos un desapareamiento que está ubicado a lo sumo a 2, preferiblemente a lo sumo a 1 nucleótido del extremo 3' de dicho oligonucleótido. Más preferiblemente, dicho (al menos un) desapareamiento está en el extremo 3' del oligonucleótido. Una persona experta en la materia  
30 entiende lo que abarca el término extremo 3'. Una molécula de ADN de cadena sencilla no circular tiene dos extremos, el extremo 3' y el extremo 5' (también denominados «extremo tres prima» y «extremo cinco prima»).

**[0043]** El extremo 5' de un ácido nucleico de cadena sencilla designa el nucleótido específico del cual el átomo de carbono C-5 constituye el átomo de carbono terminal del esqueleto de azúcar-fosfato. El átomo de  
35 carbono C-5 puede o no estar unido a un grupo fosfato mediante un enlace fosfodiéster, pero este grupo fosfato a su vez no forma ningún enlace con otro nucleótido.

El extremo 3' de un ácido nucleico de cadena sencilla 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 fosfodiéster o de otra forma.  
40

El átomo C-5 es el 5º átomo de carbono de la molécula de ribosa o desoxirribosa y no forma parte del anillo de furanosa, empezando a contar desde el átomo C directamente adyacente tanto al oxígeno del anillo de furanosa como a la base nitrogenada. El átomo C-3 es el 3º átomo de carbono de la molécula de ribosa o desoxirribosa y  
45 forma parte del anillo de furanosa, empezando a contar desde 1 que es el átomo C directamente adyacente tanto al oxígeno del anillo de furanosa como a la base nitrogenada.

**[0044]** El término «desapareamiento ubicado a 2 nucleótidos del extremo 3'» indica que el desapareamiento está a dos nucleótidos del nucleótido del extremo 3' del oligonucleótido. El término «desapareamiento ubicado a  
50 1 nucleótido del extremo 3'» indica que el desapareamiento está a un nucleótido del nucleótido del extremo 3' del oligonucleótido. El término «desapareamiento ubicado a 0 nucleótidos del extremo 3'» indica que el desapareamiento está en el nucleótido del extremo 3' del oligonucleótido.

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

**[0046]** En determinadas realizaciones preferidas, el oligonucleótido es complementario a la primera secuencia de ADN a lo largo de la longitud completa del oligonucleótido, excepto para el desapareamiento ubicado a lo sumo a 2, preferiblemente a lo sumo a 1 nucleótido del extremo 3' de dicho oligonucleótido, más preferiblemente

dicho desapareamiento está en el extremo 3' del oligonucleótido. En otra realización, el oligonucleótido es (en el sentido 5' a 3') complementario a la primera secuencia de ADN a lo largo de la longitud completa del oligonucleótido hasta la posición del desapareamiento (localizado a 2, 1, o 0 nucleótidos del extremo 3').

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

10 **[0048]** La modificación de una base, las modificaciones de una base del extremo 3' y/o 5', la modificación del esqueleto y/o las modificaciones de un azúcar se pueden incorporar en los oligonucleótidos para aumentar la afinidad (de unión/hibridación) de los oligonucleótidos por la secuencia diana y, ya sea independientemente o ya sea adicionalmente, aumentar la resistencia de los oligonucleótidos a las nucleasas celulares. No obstante, como se muestra en el ejemplo 3, no es necesario que el oligonucleótido incorpore algún nucleótido modificado.

15

**[0049]** Se puede usar ventajosamente cualquier modificación de un nucleótido de un oligonucleótido que proporcione un oligonucleótido adecuado para su uso en el procedimiento según la invención (y que comprenda al menos un desapareamiento ubicado a lo sumo a 2, preferiblemente a lo sumo a 1 nucleótido del extremo 3' de dicho oligonucleótido, más preferiblemente dicho desapareamiento está en el extremo 3' del oligonucleótido). El experto en la materia entenderá que una modificación se refiere a uno cualquiera de los nucleótidos A, C, T y G naturales.

20

**[0050]** De forma ventajosa, aunque no es esencial para la invención, el oligonucleótido para su uso en el procedimiento según la invención puede comprender nucleótidos modificados que aumenten la resistencia del oligonucleótido a las nucleasas celulares, si se compara con los nucleótidos A, T, C y G naturales. Estas modificaciones pueden incluir modificaciones de bases, modificaciones del esqueleto y/o modificaciones del azúcar. Normalmente, dichos nucleótidos modificados que aumentan la resistencia del oligonucleótido a las nucleasas celulares pueden dar lugar a una mayor estabilidad del oligonucleótido en un entorno celular, lo que puede resultar en un mejor intercambio dirigido de nucleótidos. Preferiblemente, el oligonucleótido para su 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 a las nucleasas celulares si se compara con los nucleótidos A, T, C y G naturales. Alternativamente, o al mismo tiempo, el oligonucleótido para su uso según el procedimiento de la invención comprende a lo sumo 25, preferiblemente a lo sumo 20, más preferiblemente a lo sumo 15, más preferiblemente a lo sumo 10 nucleótidos modificados que aumentan la resistencia del oligonucleótido a las nucleasas celulares si se compara con los nucleótidos A, T, C y G naturales. Dichos nucleótidos modificados pueden estar ubicados en cualquier posición dentro del oligonucleótido, preferiblemente antes de 20 nucleótidos, preferiblemente antes de 15, más preferiblemente antes de 10, incluso más preferiblemente antes de 8, incluso más preferiblemente antes de 6 nucleótidos del extremo 3' y/o 5' del oligonucleótido, y lo más preferiblemente en los últimos nucleótidos del extremo 3' y/o en los últimos nucleótidos del extremo 5'. Cuando el desapareamiento que se va a incorporar en la secuencia de ADN diana se localiza a cero, uno o a lo sumo a dos nucleótidos del extremo 3' del oligonucleótido, se prefiere en particular que dicho(s) nucleótido(s) modificado(s) protejan el lado 3' frente a las nucleasas celulares y, por tanto, estén ubicados en el extremo 3' del oligonucleótido, como por ejemplo a 20, 15, 10, 9, 8, 7, 6 o 4 nucleótidos del extremo 3'. No obstante, como se descrito previamente, y como se muestra en el ejemplo 3, no es esencial para la invención que el oligonucleótido incluya de hecho nucleótidos modificados que aumenten la resistencia del oligonucleótido a las nucleasas celulares.

45

**[0051]** Varios de dichos nucleótidos modificados se mencionan en el presente documento, los cuales aumentan la resistencia del oligonucleótido a las nucleasas celulares si se comparan con los nucleótidos A, T, C y G naturales y los cuales se pueden incorporar en el oligonucleótido para su uso en el procedimiento según la invención. Dicho nucleótido modificado puede ser un nucleótido que tenga enlaces fosforotioato, pero también puede tener una fosforomidita, un metilfosfonato o un nucleótido con enlaces no fosfato entre nucleótidos, como carbonatos, carbamatos, siloxano, sulfonamidas y ácido nucleico poliamida. Además, pueden usarse los nucleótidos modificados que confieren resistencia a nucleasas celulares como se describe en el documento WO0226967, como el ácido nucleico bloqueado (LNA, por sus siglas en inglés), o cualquier otro nucleótido modificado que mejore la resistencia a nucleasas celulares del oligonucleótido como conocen los expertos en la materia.

50

**[0052]** Alternativa o adicionalmente a los nucleótidos modificados que confieren resistencia a nucleasas descritos anteriormente, el oligonucleótido que se va a usar en el procedimiento según la invención puede comprender nucleótidos modificados que tienen mayor afinidad por la secuencia de ADN diana si se compara con

los nucleótidos A, T, C y G naturales. Esta modificación puede incluir modificaciones de bases, modificaciones del esqueleto y/o modificaciones del azúcar. Normalmente, dichos nucleótidos modificados que tienen mayor afinidad de unión tendrán como efecto el emparejamiento de bases más fuerte con la secuencia diana, lo que puede dar lugar a una mayor estabilidad del híbrido entre el oligonucleótido y la secuencia diana, lo que se cree tiene como consecuencia un mejor intercambio dirigido de nucleótidos. Preferiblemente, el oligonucleótido para su 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 o 4, incluso más preferiblemente 2 nucleótidos modificados que tienen una afinidad de unión más alta por la secuencia de ADN diana si se compara con los nucleótidos A, T, C y G naturales. Dichos nucleótidos modificados según se menciona anteriormente pueden estar ubicados en cualquier posición dentro del oligonucleótido, preferiblemente en una posición a una distancia de un nucleótido del desapareamiento, preferiblemente a lo sumo a 2, 3, 4, 5, 6 o 7 nucleótidos de distancia del desapareamiento. Preferiblemente, dicho nucleótido modificado se localiza en el lado 5' del desapareamiento, aunque también se puede optar por ubicar dicho nucleótido modificado en el lado 3' del desapareamiento, si el desapareamiento no está ubicado en el último nucleótido del extremo 3' del oligonucleótido.

15 **[0053]** En este documento se mencionan varios ejemplos de dichos nucleótidos modificados que tienen una afinidad de unión más alta por la secuencia de ADN diana si se compara con los nucleótidos A, T, C y G naturales, los cuales se pueden incorporar en el oligonucleótido para su uso en el procedimiento según la invención, que incluyen la sustitución 2-OMe, LNA (ácido nucleico bloqueado), ribonucleótido, superA, superT o cualquier otro tipo de nucleótido modificado que mejore la afinidad de unión del oligonucleótido por la secuencia de ADN diana si se compara con los nucleótidos A, T, C y G naturales, como conocen los expertos en la materia.

20 **[0054]** La determinación de si un nucleótido modificado confiere mayor resistencia a nucleasas celulares si se compara con los nucleótidos T, A, C y G naturales puede realizarse, por ejemplo, comparando los tiempos de semivida de un oligonucleótido que contenga dicho nucleótido modificado con los de un nucleótido que no contenga dicho nucleótido modificado, en presencia de nucleasas celulares, como por ejemplo, las presentes en extracto de tomate, células de tomate o *E. coli*. Si el tiempo de semivida del primero mencionado es superior, dicho nucleótido modificado confiere mayor resistencia a nucleasas celulares si se compara con los nucleótidos A, T, C y G naturales. La determinación de si un nucleótido modificado confiere mayor afinidad de unión por la secuencia de ADN diana si se compara con los nucleótidos A, T, C y G naturales puede realizarse, por ejemplo, comparando la temperatura de fusión (T<sub>f</sub>) de la doble cadena formada entre el oligonucleótido que contiene dicho nucleótido modificado y su diana y la formada por el oligonucleótido que no contiene dicho nucleótido modificado y su diana. Si la temperatura de fusión del primero mencionado es superior, dicho nucleótido modificado confiere mayor afinidad de unión por la secuencia ADN diana si se compara con los nucleótidos A, T, C y G naturales.

35 **[0055]** Se entiende que una sección según la presente invención es 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 puede estar ubicada en el lado 3' y/o el lado 5' del desapareamiento. La al menos una sección puede ser parte de un dominio según la invención; en otras palabras, la sección puede ser un dominio que puede hibridar con la primera secuencia de ADN. Alternativamente, la sección puede solaparse con un dominio, ya sea completa o parcialmente. En caso de solapamiento completo, la sección puede tener la misma longitud que el dominio, pero también puede tener una longitud que exceda la longitud del dominio. En caso de solapamiento parcial, el dominio y la sección comparten al menos un nucleótido.

45 **[0056]** Dependiendo del tipo de modificación usada en el oligonucleótido, puede existir una preferencia para que el nucleótido modificado sea parte de un dominio que pueda hibridar con la primera secuencia de ADN, y cuyo dominio comprenda o esté directamente adyacente a al menos un desapareamiento ubicado a lo sumo a 2, preferiblemente a lo sumo a 1 nucleótido del extremo 3' de dicho oligonucleótido, más preferiblemente dicho desapareamiento está en el extremo 3' del oligonucleótido. Este es en particular el caso de nucleótidos modificados con una afinidad de unión más alta en comparación con los nucleótidos A, C, T o G naturales con su nucleótido complementario.

50 **[0057]** Las modificaciones de bases incluyen, aunque sin limitaciones, dichas modificaciones como por ejemplo las descritas en el documento WO0226967, que incluyen modificaciones en la posición C-5 de las pirimidinas, tales como 2'-desoxiuridina, 5-fluoro-2'-desoxiuridina, 5-bromo-2'-desoxiuridina y 5-metil-2'-desoxicitidina. Otras modificaciones de bases incluyen bases nitrogenadas sintéticas y naturales como 5-metilcitosina, 5-hidroximetil citosina, xantina, hipoxantina, 2-aminoadenina, 6-metil y otros derivados alquilo de adenina y guanina, 2-propil y otros derivados 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-hidroxiilo y otras adeninas y guaninas 8-substituidas, 5-halo especialmente 5-bromo, 5-trifluorometilo y otros uracilos y citosinas 5-substituidas, 7-metilguanina y 7-metiladenina, 8-azaguanina y 8-azaadenina, 7-desazaguanina y 7-desazaadenina y 3-desazaguanina y 3-desazaadenina.

- 5 **[0058]** Las modificaciones de los extremos (3' y/o 5') pueden incluir bases 2'-O-metilo, grupos 3' amino, enlaces fosforotioato y cualquier otra modificación que sea resistente a nucleasas. Los expertos en la materia son muy conscientes de estos tipos de modificaciones. Se cree que conferir resistencia a nucleasas mejora adicionalmente el intercambio dirigido de nucleótidos.
- 10 **[0059]** Varias modificaciones del esqueleto, como las mencionadas en el documento WO0226967, que incluyen fosforotioatos, fosforamiditas y metilfosfonatos, y aquellas con enlaces no fosfato entre nucleótidos, como carbonatos, carbamatos, siloxano, sulfonamidas y ácido nucleico poliamida aumentarán la resistencia a nucleasas celulares. Dichas modificaciones del esqueleto son, por tanto, útiles en el oligonucleótido usado en el procedimiento según la invención.
- 15 **[0060]** Asimismo, modificaciones del azúcar, que incluyen, aunque sin limitaciones, 2'-O- metilo, 2'-fluoro o 2'-metoxietoxi pueden aumentar la estabilidad termodinámica de una doble cadena formada, y al mismo tiempo proporcionar mejor resistencia a nucleasas.
- 20 **[0061]** En el documento WO2007073149 se describen otros ejemplos de modificaciones adecuadas. La modificación de los oligonucleótidos donadores puede, por ejemplo, comprende enlaces fosforotioato, sustituciones 2-OMe, el uso de LNA (ácidos nucleicos bloqueados), ribonucleótido y otras bases que modifican, y preferiblemente mejoran, la estabilidad del híbrido entre el oligonucleótido y la cadena aceptora mejorando la afinidad de unión por el ADN diana o mediante la inhibición de la actividad nucleasa, o ambas.
- 25 **[0062]** Todos estos tipos de modificaciones son bien conocidas por los expertos en la materia y están fácilmente disponibles en diversas fuentes comerciales.
- 30 **[0063]** En una realización se proporciona un procedimiento según la invención en el que un nucleótido modificado se incorpora en el oligonucleótido y en el que el nucleótido modificado tiene una afinidad de unión más alta en comparación con los nucleótidos A, C, T o G naturales con su nucleótido complementario, y en el que el nucleótido modificado se une con más fuerza a un nucleótido en la posición opuesta en la primera secuencia de ADN en comparación con un nucleótido natural complementario al nucleótido de la posición opuesta en la primera secuencia de ADN y/o en el que el nucleótido modificado es un nucleótido resistente a nucleasas.
- 35 **[0064]** Preferiblemente la modificación es una modificación de una base, una modificación de una base del extremo 3' y/o el extremo 5', una modificación del esqueleto o una modificación de un azúcar. Como se discute anteriormente, los oligonucleótidos donadores según la invención pueden contener modificaciones para mejorar las características de hibridación de modo que el donador exhibe mayor afinidad por la cadena de ADN diana, lo que puede facilitar la intercalación del donador y/o aumentar la estabilidad termodinámica de la doble cadena formada (en comparación con el mismo oligonucleótido que no comprende dicha modificación y en las mismas circunstancias experimentales). El oligonucleótido donador puede, independientemente o además, modificarse para hacerse más resistente a nucleasas, lo que puede estabilizar la estructura de doble cadena.
- 40 **[0065]** En la técnica previa se ha descrito una amplia variedad de nucleótidos modificados que tienen una afinidad de unión más alta en comparación con los nucleótidos A, C, T o G naturales con su nucleótido complementario, y en el que el nucleótido modificado se une con más fuerza a un nucleótido en la posición opuesta en la primera secuencia de ADN en comparación con un nucleótido natural complementario al nucleótido de la posición opuesta en la primera secuencia de ADN y/o en el que el nucleótido modificado es un nucleótido resistente a nucleasas (véase por ejemplo el documento WO2007073157 y las diversas modificaciones que se discuten anteriormente).
- 45 **[0066]** En determinadas realizaciones, una modificación está en una posición a un nucleótido de distancia del desapareamiento, preferiblemente a 2, 3, 4, 5, 6 o 7 nucleótidos de distancia del desapareamiento. En determinadas realizaciones, la modificación se localiza en una posición posterior al desapareamiento. En determinadas realizaciones, la modificación se localiza en una posición anterior al desapareamiento.
- 50 **[0067]** El dominio que contiene o está directamente adyacente al desapareamiento y a las secciones que contienen los nucleótidos modificados pueden estar solapadas. De este modo, en determinadas realizaciones, el

dominio que contiene el desapareamiento o directamente adyacente al desapareamiento se localiza en una posición diferente en el oligonucleótido que la sección de la cual se considera la modificación. En determinadas realizaciones, el dominio incorpora una o más secciones. En determinadas realizaciones, las secciones pueden incorporar el dominio. En determinadas realizaciones, el dominio y las secciones pueden estar localizadas en la misma posición en el oligonucleótido y tener la misma longitud, es decir, las secciones coinciden en longitud y posición. En determinadas realizaciones puede haber más de una sección en un dominio.

**[0068]** Para la presente invención, esto significa que la parte del oligonucleótido que contiene el desapareamiento que altera la doble cadena de ADN se puede localizar en una posición diferente o cambiada respecto a la parte del oligonucleótido que se modificó.

**[0069]** En una realización preferida, el nucleótido modificado se selecciona a partir del grupo compuesto por LNA y/o nucleótidos que tienen enlaces fosforotioato.

**[0070]** En una realización preferida, el nucleótido modificado es un ácido nucleico bloqueado. El ácido nucleico bloqueado (LNA) es un ADN análogo con propiedades interesantes para el uso en terapia génica con oligonucleótidos complementarios que es conocido por los expertos en la materia.

**[0071]** Los LNA son análogos de nucleótidos y nucleósidos bicíclicos y tricíclicos que pueden incorporarse en oligonucleótidos. Las características estructurales y funcionales básicas de los LNA y análogos relacionados se describen en diversas publicaciones y patentes, como los documentos WO99/14226, WO00/56748, WO00/66604, WO98/39352, US6043060 y US6268490, todos los cuales se incorporan en el presente documento por referencia en su totalidad.

**[0072]** Existen nucleósidos LNA disponibles para todas las bases nitrogenadas comunes (T, C, G, A, U; por ejemplo de Exiqon [www.exiqon.com]) y son capaces de formar pares de bases según las reglas de apareamiento de bases de Watson-Crick. Cuando se incorpora en un oligonucleótido de ADN, el LNA hace que el apareamiento con una hebra de nucleótidos complementaria sea más rápido y aumente la estabilidad de la doble cadena resultante. En otras palabras, el LNA combina la capacidad para discriminar entre dianas correctas e incorrectas (alta especificidad) con muy alta bioestabilidad (bajo recambio) y afinidad sin precedentes (muy alta fuerza de unión a la diana). De hecho, el aumento de afinidad registrado con LNA deja las afinidades de todos los análogos previamente descritos en el rango de bajas a modestas.

**[0073]** El LNA es un análogo de ARN en el que la ribosa está estructuralmente limitada por un puente metileno entre los átomos 2'-oxígeno y 4'-carbono. Este puente limita la flexibilidad del anillo de ribofuranosa y bloquea la estructura en una formación bicíclica rígida. Esta llamada conformación tipo N (o 3'-endo) da lugar a un aumento de la  $T_f$  (temperatura de fusión) de las dobles cadenas que contienen LNA y, en consecuencia, a afinidades de unión más altas y mayores especificidades. Es de resaltar que las características favorables del LNA no se logran a expensas de otras propiedades importantes como se observa a menudo con los análogos de ácidos nucleicos.

**[0074]** El LNA puede mezclarse libremente con todos los compuestos químicos que constituyen el universo de análogos de ADN. Las bases de LNA se pueden incorporar en oligonucleótidos como secuencias cortas todo LNA o como quimeras de LNA/ADN más largas. Los LNA se pueden colocar en posiciones internas, 3' o 5'. Sin embargo, debido a sus conformaciones bicíclicas rígidas, los restos LNA a veces alteran el giro de hélice de las hebras de ácido nucleico. Por consiguiente, generalmente se prefiere menos diseñar un oligonucleótido con dos o más restos LNA adyacentes. Preferiblemente, los restos LNA están separados por al menos un nucleótido (modificado) que no altere el giro de hélice, como por ejemplo un nucleótido convencional (A, C, T o G).

**[0075]** El monómero de LNA desarrollado y preferido originalmente (el monómero [beta]-D-oxi-LNA) se ha modificado en nuevos monómeros LNA. Se ha sugerido que el nuevo [alfa]-L-oxi-LNA muestra una estabilidad superior frente a la actividad 3' exonucleasa, y también es más potente y más versátil que [beta]-D-oxi-LNA en el diseño de oligonucleótidos complementarios potentes. También se pueden usar xilo-LNA, L-ribo LNA y otros LNA, como se describe en los documentos WO9914226, WO00/56748, WO00/66604 y en J. Org. Chem., 2010, 75 (7), pág. 2341-2349. En la presente invención, cualquier LNA de los tipos anteriores es eficaz para lograr los objetivos de la invención, es decir, mejor eficiencia de IDN, con preferencia por análogos [beta]-D-LNA.

**[0076]** Como se menciona anteriormente, un LNA está preferiblemente al menos a un nucleótido de distancia de un desapareamiento en el oligonucleótido usado en el procedimiento de la invención. Aunque en la técnica de

IDN, la modificación con LNA se ha incluido en una lista de posibles modificaciones de oligonucleótidos como alternativas a las moléculas quiméricas usadas en IDN, se ha encontrado que cuando se modifican oligonucleótidos de ADN de cadena sencilla, como los usados en el procedimiento según la invención, para contener LNA, la eficiencia del IDN aumenta significativamente hasta el grado que se ha encontrado actualmente cuando el LNA se ubica al menos a un nucleótido de distancia del desapareamiento, incluso más preferiblemente a un nucleótido del desapareamiento. El oligonucleótido preferiblemente no contiene más de aproximadamente el 75 % (redondeando al número entero más próximo de nucleótidos) de LNA.

**[0077]** En otra realización preferida, el nucleótido modificado comprende un nucleótido que tiene un enlace fosforotioato. Muchas de las modificaciones de nucleótidos disponibles en el mercado se han desarrollado para su uso en aplicaciones con oligonucleótidos complementarios para terapia génica. El proceso químico de resistencia a nucleasas más simple y más ampliamente utilizado disponible para aplicaciones con oligonucleótidos complementarios (el oligonucleótido complementario de «primera generación») es el enlace fosforotioato (PS). En estas moléculas, un átomo de azufre sustituye a un oxígeno que no sirve de puente en el esqueleto fosfato del oligonucleótido (véase, por ejemplo, la figura 2 del documento WO2007073154), lo que tiene como consecuencia la resistencia a la actividad endonucleasa y exonucleasa.

**[0078]** Para la terapia génica, una quimera fosforotioato/fosfodiéster generalmente tiene de uno a cuatro enlaces entre nucleósidos modificados PS en ambos extremos 5' y 3' con un núcleo central de ADN no modificado. Los enlaces fosforotioato se pueden incorporar, sin embargo, en cualquier ubicación que se desee en el oligonucleótido.

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

**[0080]** En una realización se ha previsto que el oligonucleótido usado en el procedimiento según la invención comprenda 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 a partir del grupo compuesto por LNA y/o enlaces fosforotioato.

**[0081]** En determinadas realizaciones preferidas de la invención, el nucleótido del oligonucleótido en la posición del desapareamiento se puede modificar. Que el desapareamiento se pueda modificar o no depende en gran medida del mecanismo exacto del intercambio dirigido de nucleótidos o del mecanismo de reparación de ADN de la célula usando la diferencia en afinidad entre las hebras donadora y aceptora. En una realización preferida, el nucleótido en la posición del desapareamiento no es un nucleótido modificado.

**[0082]** En una realización se proporciona un método según la invención en el que el nucleótido modificado está al menos a un nucleótido de el al menos un desapareamiento ubicado a lo sumo a 2, preferiblemente a lo sumo a 1 nucleótido del extremo 3' de dicho oligonucleótido, más preferiblemente, dicho al menos un desapareamiento está en el extremo 3' del oligonucleótido.

**[0083]** Como se discute previamente, se ha encontrado que cuando se modifican oligonucleótidos de ADN de cadena sencilla, como los usados en el procedimiento según la invención, para contener nucleótidos modificados, por ejemplo LNA, la eficiencia del IDN aumenta significativamente hasta el grado que se ha encontrado actualmente cuando el nucleótido modificado, preferiblemente LNA, se ubica al menos a un nucleótido de distancia del desapareamiento, incluso más preferiblemente a un desapareamiento del desapareamiento. En otros palabras, en una realización preferida, un nucleótido modificado, preferiblemente un LNA está separado del desapareamiento por 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 está directamente adyacente al nucleótido desapareado.

**[0084]** En una realización se proporciona un procedimiento, en el que la alteración del ADN de doble cadena aceptor está dentro de una célula preferiblemente seleccionada a partir del grupo compuesto por una célula procarionota, una células bacteriana, una célula eucariota, una célula vegetal, una célula animal, una célula de levadura, una célula de hongo, una célula de roedor, una célula humana, una célula no humana y/o una célula embrionaria (no humana). La invención es, en su forma más amplia, aplicable genéricamente a toda clase de organismo como humanos, animales, plantas, peces, reptiles, insectos, hongos, bacterias, etc. La invención puede,

por tanto, realizarse dentro de una célula seleccionada a partir del grupo compuesto por una célula procariota, una célula bacteriana, una célula eucariota, una célula vegetal, una célula animal, una célula de levadura, una célula de hongo, una célula de roedor, 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

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

10

**[0086]** 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, más preferiblemente un nucleótido. Más preferiblemente, la alteración de la secuencia de ADN de doble cadena aceptor es una sustitución de no más de 5 nucleótidos, preferiblemente no más de 4, 3, 2, 1 nucleótido, más preferiblemente un nucleótido.

15

**[0087]** En otra realización se proporciona un procedimiento según la invención, en el que el ADN de doble cadena aceptor procede de ADN genómico, ADN lineal, cromosomas artificiales, cromosomas artificiales de mamífero, cromosomas artificiales bacterianos, cromosomas artificiales de levaduras, cromosomas artificiales vegetales, ADN cromosómico nuclear, ADN de orgánulos y/o ADN episomal incluidos plásmidos.

20

**[0088]** De hecho, la invención es aplicable a la modificación de cualquier tipo de ADN, como las descritas anteriormente. La invención se puede realizar *in vivo*, así como *ex vivo* o *in vitro*, por ejemplo sometiendo el ADN que se va a modificar al oligonucleótido donador en presencia de proteínas que son capaces de realizar el intercambio dirigido de nucleótidos, por ejemplo, y en particular, proteínas que son funcionales en el mecanismo de reparación de desapareamientos de la célula.

25

**[0089]** La administración del oligonucleótido a una célula se puede lograr mediante electroporación u otras técnicas convencionales que permitan la administración al núcleo o al citoplasma. El análisis *in vitro* del procedimiento de la presente invención se puede realizar usando el sistema libre de células como se describe en los documentos WO01/87914, WO03/027265, WO99/58702 y WO01/92512. El oligonucleótido puede comprender nucleótidos metilados, nucleótidos no metilados o ambos.

30

35

**[0090]** La invención es, en su forma más amplia, aplicable a muchos fines para alterar una célula, corrigiendo una mutación mediante el restablecimiento del tipo natural, induciendo una mutación, inactivando una enzima mediante la interrupción de la región codificadora, modificando la bioactividad de una enzima mediante la alteración de la región codificadora o modificando una proteína mediante la interrupción de la región codificadora.

40

**[0091]** La invención también se refiere al uso de oligonucleótidos esencialmente como se describe anteriormente en este documento, para alterar una célula, corregir una mutación mediante el restablecimiento del tipo natural, inducir una mutación, inactivar una enzima mediante la interrupción de la región codificadora, modificar la bioactividad de una enzima mediante la alteración de la región codificadora, modificar la proteína mediante la interrupción de la región codificadora, modificar una proteína mediante la interrupción de la región codificadora, reparación del desapareamiento, alteración dirigida del material genético (vegetal), incluido mutación génica, reparación dirigida de genes y silenciamiento de genes. Preferiblemente, el procedimiento según la invención es para la alteración dirigida del ADN de doble cadena aceptor obtenido a partir de una planta, presente en una planta o para ser presentado a una planta.

45

50

**[0092]** La descripción además se refiere a kits, que comprenden uno o más oligonucleótidos como se define en otra parte en este documento, opcionalmente en combinación con proteínas que son capaces de realizar el IDN.

**[0093]** En particular, el kit incluye las instrucciones para la alteración dirigida de un ADN de doble cadena. Las instrucciones incluyen esencialmente una descripción de los pasos del procedimiento según la invención descrito en este documento.

55

**[0094]** En particular, se describe un kit que incluye instrucciones para la realización de un procedimiento para la alteración dirigida de un ADN de doble cadena aceptor según la invención descrito en el presente documento, en

el que el kit además comprende un oligonucleótido para su uso en el procedimiento según la invención. Preferiblemente, el oligonucleótido es un oligonucleótido como se describe en este documento.

5 **[0095]** Para ello, el kit puede así incluir un oligonucleótido que comprende al menos un dominio que es capaz de hibridar con la primera secuencia de ADN cuyo dominio comprende, o está directamente adyacente a al menos un desapareamiento con respecto a una secuencia de ADN diana, y en el que dicho al menos un desapareamiento está ubicado a lo sumo a 2, preferiblemente a lo sumo a 1 nucleótido del extremo 3' de dicho oligonucleótido, más preferiblemente dicho al menos un desapareamiento está en el extremo 3' del oligonucleótido y además incluye instrucciones para realizar el procedimiento según la invención, es decir, para realizar el IDN en el que se usa un  
10 oligonucleótido que tiene un desapareamiento con respecto al ADN diana y en el que el desapareamiento está ubicado a lo sumo a 2, preferiblemente a lo sumo a 1 nucleótido del extremo 3' de dicho oligonucleótido, más preferiblemente dicho al menos un desapareamiento está en el extremo 3' del oligonucleótido.

15 **[0096]** Como entenderá un experto en la materia, facilitando instrucciones al menos se informa que un desapareamiento se ubica en el extremo 3' del oligonucleótido o a 1 nucleótido del extremo 3' o a 2 nucleótidos del extremo 3', y que el oligonucleótido se puede usar para la alteración de una secuencia de ADN de doble cadena, dicho kit que incluye estas instrucciones y el oligonucleótido es un kit dentro del alcance de los kits descrito y reivindicados anteriormente.

20 **[0097]** El kit también puede, por ejemplo, tomar la forma de un sitio web o un documento que proporcione instrucciones o información para realizar la alteración dirigida de un ADN de doble cadena aceptor según el procedimiento de la invención, como se describe en el presente documento, y el suministro u oferta (aparte) de un nucleótido adecuado para su uso en el procedimiento según la invención, y como se describe en este documento.//esp

25 **[0098]** En una realización preferida se proporciona un kit según la descripción, como se describe anteriormente, en el que el oligonucleótido es un oligonucleótido que, cuando se combina con una secuencia de ADN de doble cadena aceptora que contiene una primera secuencia de ADN y una segunda secuencia de ADN que es la complementaria de la primera secuencia de ADN, comprende un dominio que es capaz de hibridar con la  
30 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 localiza a lo sumo a 2, preferiblemente a lo sumo a 1 nucleótido del extremo 3' de dicho oligonucleótido, más preferiblemente dicho al menos un desapareamiento está en el extremo 3' del oligonucleótido.

35 **Ejemplos:**

#### **Ejemplo 1: IDN en un episoma que expresa GFP en protoplastos de tabaco**

40 **[0099]** El IDN supone la introducción de oligonucleótidos dentro de células donde inducen una mutación en el locus genómico diana, dirigida por un nucleótido desapareado en el oligonucleótido.

45 **[0100]** En los siguientes experimentos se determinó la exactitud y eficiencia del IDN mediante la realización de IDN en un episoma (plásmido) que porta una proteína fluorescente verde (GFP, por su siglas en inglés) no funcional que contiene un codon de parada en marco. La cotransfección de este plásmido junto con un oligonucleótido diseñado para reparar el codon de parada debe restablecer la expresión y actividad de GFP, lo que se consiguió, en los siguientes experimentos, a nivel de célula única 24 horas después de la transfección de protoplastos. En este primer ejemplo se describen experimentos realizados en protoplastos de tabaco.

#### **Material y procedimientos**

50

#### **Construcciones**

**[0101]** Se sintetizó el marco de lectura abierto de la GFP funcional y se optimizó el uso de codones para su uso en las *Solanaceae*. Se generó una variante de GFP con un cambio de nucleótido en la posición 82 (G por T) como se muestra en la figura 1. Esto tuvo como resultado la producción de un codon 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 GFP variante con el codon de parada (GFP-STOP) se clonaron como fragmentos *XhoI-SacI* en el sitio de clonación múltiple de un vector basado en pUC que contenía el promotor de CaMV 35S para la expresión génica en células vegetales. Esto tuvo como resultado las construcciones pKG7381 (GFP-WT) y pKG7384 (GFP-STOP). Además,

GFP se fusionó traduccionalmente a una etiqueta de 6 His y a una secuencia señal de localización nuclear (NLS, por sus siglas en inglés) para facilitar la acumulación de la proteína GFP en el núcleo de protoplastos y así mejorar nuestra capacidad de puntuar las células positivas para GFP. Estas construcciones se muestran en la figura 3.

## 5 Oligonucleótidos

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

**Tabla 1.** Oligonucleótidos usados en este estudio. El nucleótido desapareado en cada oligonucleótido aparece subrayado. Los asteriscos representan enlaces fosforotioato (PS). La orientación del oligonucleótido se proporciona como sentido (idéntico a la secuencia codificadora de GFP) o complementaria (complementaria a la secuencia codificadora de GFP). Todos los oligonucleótidos se muestran en la orientación 5'-3'. PB221 contiene una modificación con LNA (L = LNA C) además del desapareamiento.

Oligo	Secuencia	Orientación
GFP7	T*G*A*A*CAGCTCCTCGCCCTTGC*T*C*A*C (SEC ID N.º 5)	Complementaria
GFP8	T*G*A*A*CAGCTCCTAGCCCTTGC*T*C*A*C (SEC ID N.º 6)	Complementaria
PB154	G*C*A*C* <u>CACCCCGGTGAACAGCT</u> *C*T*C (SEC ID N.º 7)	Complementaria
GFP3	G*T*G*A*GCAAGGGCGGAGGAGCTG*T*T*C*A (SEC ID N.º 8)	Sentido
PB153	C*G*C*C*CTTGCTCACCATCTCGA*G*A*A*C (SEC ID N.º 9)	Complementaria
PB218	C*A*C*C*ACCCCGGTGAACAGCTC*T*C*A (SEC ID N.º 10)	Complementaria
PB219	A*C*C*A*CCCCGGTGAACAGCTCC*T*C*A*G (SEC ID N.º 11)	Complementaria
PB220	C*C*A*C*CCCGGTGAACAGCTCCT*C*A*G*C (SEC ID N.º 12)	Complementaria
PB221	G*C*A*C* <u>CACCCCGGTGAACAGCT</u> *C*L*T*C (SEC ID N.º 13)	Complementaria

15

### Aislamiento y transfección de protoplastos de tabaco

**[0103]** El material de origen para este ejemplo fueron cultivos de brotes de tabaco *in vitro*, crecidos de forma aséptica en tarros 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) con sacarosa al 2 % (p/v), sin hormonas añadidas y agar Difco al 0,8 %. Los brotes se subcultivaron cada 3 semanas en medio nuevo./esp

**[0104]** Para el aislamiento de protoplastos mesófilos, se recogieron hojas completamente expandidas de cultivos de brotes de 3-6 semanas. Las hojas se cortaron en tiras de 1 mm que se transfirieron a continuación a placas de Petri grandes (100 mm  $\times$  100 mm) con 45 ml de medio MDE basal para un tratamiento preplasmólisis de 30 min a temperatura ambiente. El medio MDE basal contenía 0,25 g de KCl, 1,0 g de  $\text{MgSO}_4\cdot 7\text{H}_2\text{O}$ , 0,136 g de  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 2,5 g de polivinilpirrolidona (PM 10 000), 6 mg de ácido naftalenacético y 2 mg de 6-bencilaminopurina en un volumen total de 900 ml. La osmolalidad de la solución se ajustó a 600  $\text{mOsm}\cdot\text{kg}^{-1}$  con sorbitol y el pH a 5,7.

30

**[0105]** Tras la preplasmólisis, se añadieron 5 ml de solución madre de enzimas a cada placa de Petri. La solución madre de enzimas consistía en 750 mg de celulasa Onozuka R10, 500 mg de driselasa y 250 mg de macerozima R10 por cada 100 ml (Duchefa B.V., Haarlem, Países Bajos, p. ej. los productos C8001 y M8002), filtrada sobre papel Whatman y esterilizada mediante filtración. Las placas de Petri se sellaron e incubaron durante toda la noche en oscuridad a 25 °C sin movimiento para digerir las paredes celulares.

35

**[0106]** La suspensión de protoplastos se pasó, a continuación, por tamices de 500  $\mu\text{m}$  y 100  $\mu\text{m}$  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 80  $\times g$  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 osmolalidad a 540  $\text{mOsm}\cdot\text{kg}^{-1}$ .

40

**[0107]** El paso de centrifugación se repitió dos veces, primero con 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 la cantidad necesaria de manitol para llevar la osmolalidad a 540  $\text{mOsm}\cdot\text{kg}^{-1}$  y, finalmente, con los protoplastos resuspendidos en medio MLs, que es medio MLm en el que se sustituye el manitol por sacarosa.

45

**[0108]** Los protoplastos se recuperaron de la banda flotante en medio con sacarosa y se resuspendieron en

un volumen igual de medio de lavado de KCl. Las densidades se determinaron usando un hemocitómetro. Posteriormente, los protoplastos se centrifugaron de nuevo en tubos de vidrio de 10 ml a  $85 \times g$  durante 5 min y el sedimento se resuspendió a una densidad de  $1 \times 10^5$  protoplastos  $\text{ml}^{-1}$  en medio de electroporación.

## 5 Electroporación de protoplastos

**[0109]** Para la electroporación se utilizó un aparato Gene Pulser de BioRad. Usando PHBS como medio de electroporación (Hepes 10 mM, pH 7,2; manitol 0,2 M, NaCl 150 mM;  $\text{CaCl}_2$  5 mM) y con una densidad de protoplastos en la mezcla de electroporación de aproximadamente  $1 \times 10^6$  por ml, los parámetros de electroporación fueron una carga de 250 V ( $625 \text{ V cm}^{-1}$ ) y una capacitancia de 800  $\mu\text{F}$  con un tiempo de recuperación entre el pulso y el cultivo de 10 minutos. Para cada electroporación se usaron aproximadamente 2  $\mu\text{g}$  de oligonucleótido y 20  $\mu\text{g}$  de KG7381 o KG7384 por 800 microlitros de electroporación.

**[0110]** Tras el tratamiento de electroporación, los protoplastos se pusieron en hielo durante 30 min para su recuperación, después se resuspendieron en medio de cultivo  $T_0$  a una densidad de  $1 \times 10^5$  protoplastos  $\text{ml}^{-1}$  y se incubaron a  $21^\circ\text{C}$  durante toda la noche en oscuridad. El medio de cultivo  $T_0$  contenía (por litro, pH 5,7) 950 mg de  $\text{KNO}_3$ , 825 mg de  $\text{NH}_4\text{NO}_3$ , 220 mg de  $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ , 185 mg de  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ , 85 mg de  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 27,85 mg de  $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ , 37,25 mg de  $\text{Na}_2\text{EDTA} \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ , 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 R.H. Wetmore, Amer. J. Bot. 38: 138-40, 1951), sacarosa al 2 % (p/v), 3 mg de ácido naftalenacético, 1 mg de 6-bencilaminopurina y la cantidad necesaria de manitol para llevar la osmolalidad a  $540 \text{ mOsm} \cdot \text{kg}^{-1}$ . Los protoplastos se examinaron al microscopio UV 20 horas después de la electroporación para visualizar la señal de GFP en el núcleo.

**[0111]** Alternativamente, el tratamiento con PEG se podía emplear para introducir el ADN del plásmido y del oligonucleótido en los protoplastos de tabaco. Los procedimientos para lograrlo son bien conocidos en la literatura.

## Resultados

**[0112]** Cuando la construcción KG7381 (GFP-WT) se electroporó a protoplastos de tabaco se observó una fuerte señal de GFP localizada en el núcleo después de aproximadamente 20 horas de incubación. Esta señal se debe a la potente expresión transitoria del ORF de GFP. Esta señal desapareció en 48 horas, presumiblemente debido a la degradación o eliminación del ADN plasmídico por parte de la célula. En un experimento típico, aproximadamente el 30 % de los protoplastos mostraban una señal de GFP; esto representa la máxima eficiencia de electroporación. No se observó señal de GFP cuando se introdujo KG7384 (GFP-STOP) en los protoplastos de tabaco.

**[0113]** Una vez validado el diseño experimental, se realizaron experimentos en los que se introducía KG7384 en los protoplastos de tabaco en combinación con varios diseños diferentes de oligonucleótidos con ubicaciones alternativas del nucleótido desapareado.

**[0114]** Cuando KG7384 se introdujo junto con oligonucleótidos que portaban un desapareamiento para reparar el codon de parada introducido, los autores observaron de hecho el restablecimiento de la expresión de GFP. No se observó expresión de GFP cuando KG7384 se introdujo junto con un oligonucleótido que carecía de desapareamiento. Se concluyó que la maquinaria celular de IDN es capaz de usar el oligonucleótido para alterar la secuencia de GFP-STOP, restableciendo así la actividad GFP en las células.

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

**[0116]** A partir de los datos se concluye que la reparación solo se produce cuando está presente un nucleótido desapareado en el oligonucleótido, ya que no se observó reparación cuando se utilizaba GFP8. Se observó reparación en aproximadamente el 30 % de las células transformadas cuando el oligonucleótido contenía un único desapareamiento en el centro (GFP7). Inesperadamente, encontramos que la eficiencia del IDN mejoraba cuando el desapareamiento se localizaba en el extremo 3' del oligonucleótido (PB154). En este caso, la eficiencia de la reparación era la más alta observada en los presentes experimentos. Sorprendentemente, un oligonucleótido con el desapareamiento en el extremo 5' (PB153) dio una eficiencia de reparación muy baja. GFP3 fue casi tan eficiente

como GFP7, PB218 y PB221.

**[0117]** A continuación se diseñó una serie de oligonucleótidos (PB218, PB219, PB220) con el desapareamiento en posición -1, -2 o -3 respectivamente en comparación con el extremo 3' del oligonucleótido. Cuando el desapareamiento se localizaba en la posición -3, la eficiencia de la reparación caía por debajo de la de GFP7. PB218 (posición -1) fue tan eficiente como GFP7. PB219 (posición -2) dio una eficiencia de reparación equivalente a PB154. Por tanto, mientras que un desapareamiento en el extremo 3' proporciona la máxima eficiencia de reparación, la ubicación del desapareamiento en las posiciones internas -1 y -2 puede proporcionar también un IDN eficiente.

**[0118]** A continuación se analizó un oligonucleótido (PB221) con una modificación con LNA en la posición -2 junto con un desapareamiento en 3'. Los nucleótido LNA aumentan la afinidad de un oligonucleótido por su diana.

**[0119]** Los resultados se muestran en la Figura 5.

### **Ejemplo 2. IDN en un episoma que expresa YFP en protoplastos de tabaco**

**[0120]** El ejemplo 1 mostraba que un oligonucleótido con un desapareamiento en el extremo 3' es eficiente en la realización de IDN. Con el fin de mostrar el amplio alcance del uso del procedimiento según la invención y excluir que la mayor eficiencia del IDN observada con el oligonucleótido 3' se debe a la secuencia específica del oligonucleótido usado en el ejemplo 1, es importante demostrar que los oligonucleótidos con una secuencia alternativa pero también con un desapareamiento ubicado según la invención, por ejemplo un desapareamiento 3', son activos en un ensayo de IDN. Además, es útil demostrar que el efecto observado también se produce en otras especies vegetales por lo que se decidió realizar experimentos similares en protoplastos de tomate.

#### **Construcciones**

**[0121]** Se generaron versiones de YFP-WT y YFP-STOP, con un cambio de nucleótido ubicado en posición 186 (C por T) que daba lugar a un codon de parada. Se muestran ambas secuencias nucleotídicas del gen YFP-STOP (figura 5) y la secuencia de proteína traducida (figura 6). Aunque los genes GFP e YFP comparten una homología de secuencia significativa, este codon de parada se diseñó en una posición diferente en la secuencia codificadora, de modo que los oligonucleótidos tendrían una secuencia completamente diferente a las usadas en los experimentos con GFP. Estos genes se clonaron después en un vector de expresión vegetal de modo que el promotor vírico 35S expresaba el ORF de YFP. Se diseñó un oligonucleótido con un desapareamiento en su extremo 3' para convertir la T de la posición 186 en la construcción YFP-STOP en una C y así restablecer la actividad YFP.

**[0122]** A continuación se muestra la secuencia de los oligonucleótidos usados para reparar el codon de parada en YFP (PB212). Los enlaces fosforotioato se representan mediante asteriscos. El desapareamiento en el oligonucleótido está subrayado.

PB212 G\*A\*T\*G\*AACTTGAGAGTAAGCTT\*T\*C\*C\*G (SEC ID N.º 14)

#### **Aislamiento y purificación de protoplastos de tomate**

**[0123]** Se ha descrito previamente el aislamiento y regeneración de protoplastos de hojas de tomate (Shahin, 1985; Tan y col., 1987a; Tan y col., 1987b) y las soluciones necesarias se pueden encontrar en estas publicaciones. Brevemente, se esterilizaron semillas de *Solanum lycopersicum* con hipoclorito al 0,1 % *in vitro* en medio MS2 estéril en un fotoperiodo de 16/8 horas a 2000 lux, 25 °C y 50-70 % de humedad relativa. Se puso 1 g de hojas recién recolectadas en una placa con 5 ml de CPW9M y, usando una hoja de bisturí, se realizaron cortes perpendiculares al tallo principal cada mm. Estos se transfirieron a una placa nueva con 25 ml de solución de enzimas (CPW9M con celulosa Onozuka RS al 2 %, macerozima Onozuka R10 al 0,4 %, 2,4-D [2 mg/ml], NAA [2 mg/ml], BAP [2 mg/ml] pH 5,8) y la digestión se llevó a cabo durante toda la noche a 25 °C en oscuridad. Los protoplastos se liberaron a continuación poniéndolos en un agitador orbital (40-50 rpm) durante 1 hora. Los protoplastos se separaron de los restos celulares pasándolos a través de un tamiz de 50 µm y lavando el tamiz dos veces con CPW9M. Los protoplastos se centrifugaron a 85 g, se desechó el sobrenadante y, a continuación, se recogieron en la mitad de volumen de CPW9M. Los protoplastos se recogieron por último en 3 ml de CPW9M y, a continuación, se añadieron 3 ml de CPW8S cuidadosamente para evitar mezclar las dos soluciones. Los protocolos se centrifugaron a 85 g durante 10 min y aquellos protoplastos viables que flotaban en la capa de la interfase se recogieron usando una

pipeta pasteur larga. El volumen de protoplastos se incrementó hasta 10 ml añadiendo CPW9M y el número de protoplastos recuperados se determinó en un hemocitómetro. La suspensión de protoplastos se centrifugó a 85 × g durante 10 minutos a 5 °C. El sobrenadante se desechó y el sedimento de protoplastos se resuspendió a una concentración final de 10<sup>6</sup>·ml<sup>-1</sup> en medio de lavado CPW9M. En un tubo de 10 ml se mezclaron suavemente pero a fondo 250 µl de la suspensión de protoplastos +/-12,5 µg de ARNdc y 250 µl de solución PEG (PEG4000 al 40 % [Fluka N.º 81240], Ca(NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub> 0,1 M, manitol 0,4 M). Después de 20 min de incubación a temperatura ambiente, se añadieron 5 ml de Ca(NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub> 0,275 M frío gota a gota. La suspensión de protoplastos se centrifugó durante 10 min a 85 × g a 4 °C y se desechó el sobrenadante. A continuación, los protoplastos de tomate se transfirieron a placas Petri de 4 cm con 4 ml de medio de cultivo K8p y se examinó la expresión de YFP después de 24 h con un microscopio de fluorescencia.

## Resultados

**[0124]** Los resultados de estos experimentos se muestran en la figura 7. Los autores pudieron confirmar que un oligonucleótido de una secuencia diferente con un desapareamiento en el extremo 3' era capaz, de hecho, de restablecer la expresión de YFP en protoplastos de tomate.

### Ejemplo 3. Efectos del enlace PS sobre la eficiencia del IDN

**[0125]** Este ejemplo muestra que no es necesario que el oligonucleótido según la invención incorpore nucleótidos que tengan enlaces fosforotioato ni que el oligonucleótido según la invención incorpore ningún otro tipo de modificación.

### Métodos

**[0126]** Se aislaron protoplastos mesófilos de tomate de hojas jóvenes de plantas de tomate *in vitro*. Las construcciones indicadoras portadoras de un gen eYFP(parada) cuya expresión estaba dirigida por el promotor de CaMV 35S y los oligonucleótidos se transfirieron en protoplastos de tomate mediante un método mediado por PEG. Después de incubar toda la noche en oscuridad a 30 °C en una cámara de crecimiento, los protoplastos infectados se observaron al microscopio de fluorescencia equipado con un juego de filtros para YFP. Se anotó el número de protoplastos que emitían fluorescencia amarilla y se calcula la eficiencia del IDN dividiendo el número de protoplastos amarillos entre el número de protoplastos transfiridos.

**[0127]** Secuencia de los oligonucleótidos probados:

PB72 C\*A\*T\*G\*CATGCATGCATGCATGC\*A\*T\*G\*C (SEC ID N.º 15) 25 mer, PS, sin sentido (=control)

PB243 G\*A\*T\*G\*AACTTAAGTGTAAGTTT\*A\*C\*C\*G (SEC ID N.º 16) 25 mer, PS, 3' DA (=desapareamiento) complementario

TF8 GATGAACCTTAAGTGTAAGTTTACCG (SEC ID N.º 17) 25 mer, 3' DA complementario

\* representa un enlace fosforotioato

**[0128]** La reacción de IDN causada por PB243 y TF8 convierte la secuencia diana de TAA en TAC. Los oligonucleótidos PB243 y TF8 se diseñaron, por tanto, para reparar el codón de parada de YFP, en el que PB72 contiene enlaces PS y TF8 no contiene enlaces PS. Como se muestra en la figura 8, PB243 era capaz de restablecer la expresión de YFP con una eficiencia del 20,13 %, mientras que TF8 era capaz de restablecer la expresión de YFP con una eficiencia del 5,83 %, por tanto, considerablemente más alta (casi 15 veces y casi 4 veces, respectivamente) en comparación con el nivel de fondo de 1,43 del oligonucleótido sin sentido.

**[0129]** Este ejemplo muestra de este modo que se pueden usar oligonucleótidos, con o sin modificación, como enlaces PS, en el IDN.

## Bibliografía

**[0130]**

Alexeev, V. y 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. y 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.
- 5 Dong, C., Beetham, P., Vincent, K. y 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. y Yoon, K. (2001). Targeted gene correction by small single-stranded oligonucleotides in mammalian cells. *Gene Ther* 8, 391-9.
- 10 Kmiec, E. B. (2003). Targeted gene repair -- in the arena. *J Clin Invest* 112, 632-6.
- Kochevenko, A. y Willmitzer, L. (2003). Chimeric RNA/DNA oligonucleotide-based site-specific modification of the tobacco acetolactate synthase gene. *Plant Physiol* 132, 174-84.
- 15 Liu, L., Cheng, S., van Brabant, A. J. y Kmiec, E. B. (2002). Rad51 p and Rad54p, but not Rad52p, elevate gene repair in *Saccharomyces cerevisiae* directed by modified single-stranded oligonucleotide vectors. *Nucleic Acids Res* 30, 2742-50.
- 20 Okuzaki, A. y 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. y Kmiec, E. B. (2005). Gene therapy progress and prospects: targeted gene repair. *Gene Ther* 12, 639-46.
- 25 Rice, M. C., Czymmek, K. y 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. y D'Halluin, K. (2003). Spontaneous mutation frequency in plants obscures the effect of chimeroplasty. *Plant Mol Biol* 53, 675-89.
- 30 Shahin, E. A. (1985). Totipotency of tomato protoplasts. *Theor. Appl. Genet.* 69, 235-240.
- Tan, M.-L. M. C., Colijn-Hooymans, C. M., Lindhout, W. H. y Kool, A. J. (1987a). A comparison of shoot regeneration from protoplasts and leaf discs of different genotypes of the cultivated tomato. *Theor. Appl. Genet.* 75, 105-108.
- 35 Tan, M.-L. M. C., Rietveld, E. M., van Marrewijk, G. A. M. y Kool, A. J. (1987b). Regeneration of leaf mesophyll protoplasts of tomato cultivars (*L. esculentum*): factors important for efficient protoplast culture and regeneration. *Plant Cell Reports* 6, 172-175.
- 40 Zhu, T., Mettenburg, K., Peterson, D. J., Tagliani, L. y Baszczynski, 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., Baszczynski, C. L. y 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.
- 45

LISTADO DE SECUENCIAS

- 50 **[0131]**
- <110> Keygene N.V.
- <120> Alteración dirigida de ADN
- 55 <130> P30351EP01
- <160> 17
- <170> PatentIn versión 3.5

ES 2 588 482 T3

<210> 1  
 <211> 786  
 <212> ADN  
 5 <213> Secuencia artificial

<220>  
 <223> ORF de GFP con un codon de parada

10 <400> 1

```

atgggaagag gatcgcatca ccaccatcat cataagcttc caaagaagaa gaggaaggtt      60
ctcgagatgg tgagcaaggg ctaggagctg ttcaccgggg tggtgcccat cctggtcgag      120
ctggacggcg acgtaaacgg ccacaagttc agcgtgtccg gcgagggcga gggcgatgcc      180
acctacggca agctgaccct gaagttcatc tgcaccaccg gcaagctgcc cgtgccctgg      240
cccaccctcg tgaccaccct gacctacggc gtgcagtgct tcagccgcta ccccgaccac      300
atgaagcagc acgacttctt caagtccgcc atgcccgaag gctacgtcca ggagcgcacc      360
atcttcttca aggacgacgg caactacaag acccgcgccg aggtgaagtt cgagggcgac      420
accctggtga accgcatcga gctgaagggc atcgacttca aggaggacgg caacatcctg      480
gggcacaagc tggagtacaa ctacaacagc cacaacgtct atatcatggc cgacaagcag      540
aagaacggca tcaaggtgaa cttcaagatc cgccacaaca tcgaggacgg cagcgtgcag      600
ctcgccgacc actaccagca gaacaccccc atcggcgacg gccccgtgct gctgccccgac      660
aaccactacc tgagcaccca gtccgccctg agcaaagacc ccaacgagaa gcgcgatcac      720
atggtcctgc tggagttcgt gaccgccgcc gggatcactc tcggcatgga cgagctgtac      780
aagtaa                                          786
    
```

<210> 2  
 15 <211> 260  
 <212> PROT  
 <213> Secuencia artificial

<220>  
 20 <223> Proteína GFP-STOP

<400> 2

```

Met Gly Arg Gly Ser His His His His His His Lys Leu Pro Lys Lys
1           5           10           15
25
    
```

ES 2 588 482 T3

Lys Arg Lys Val Leu Glu Met Val Ser Lys Gly Glu Leu Phe Thr Gly  
 20 25 30  
 Val Val Pro Ile Leu Val Glu Leu Asp Gly Asp Val Asn Gly His Lys  
 35 40 45  
 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  
 Thr Leu Val Thr Thr Leu Thr Tyr Gly Val Gln Cys Phe Ser Arg Tyr  
 85 90 95  
 Pro Asp His Met Lys Gln His Asp Phe Phe Lys Ser Ala Met Pro Glu  
 100 105 110  
 Gly Tyr Val Gln Glu Arg Thr Ile Phe Phe Lys Asp Asp Gly Asn Tyr  
 115 120 125  
 Lys Thr Arg Ala Glu Val Lys Phe Glu Gly Asp Thr Leu Val Asn Arg  
 130 135 140  
 Ile Glu Leu Lys Gly Ile Asp Phe Lys Glu Asp Gly Asn Ile Leu Gly  
 145 150 155 160  
 His Lys Leu Glu Tyr Asn Tyr Asn Ser His Asn Val Tyr Ile Met Ala  
 165 170 175  
 Asp Lys Gln Lys Asn Gly Ile Lys Val Asn Phe Lys Ile Arg His Asn  
 180 185 190  
 Ile Glu Asp Gly Ser Val Gln Leu Ala Asp His Tyr Gln Gln Asn Thr  
 195 200 205  
 Pro Ile Gly Asp Gly Pro Val Leu Leu Pro Asp Asn His Tyr Leu Ser  
 210 215 220  
 Thr Gln Ser Ala Leu Ser Lys Asp Pro Asn Glu Lys Arg Asp His Met  
 225 230 235 240  
 Val Leu Leu Glu Phe Val Thr Ala Ala Gly Ile Thr Leu Gly Met Asp  
 245 250 255  
 Glu Leu Tyr Lys  
 260

<210> 3  
 <211> 786  
 <212> ADN  
 5 <213> Secuencia artificial

<220>  
 <223> Construcción YFP-STOP

10 <400> 3

<b>atgggaagag gatcgcatca ccaccatcat cataagcttc caaagaagaa gaggaaggtt</b>	<b>60</b>
<b>ctcgagatgg tttctaaggg tgaggaactt ttcactgggtg tggttccaat tctcgttgag</b>	<b>120</b>
<b>cttgatgggtg atgttaacgg acacaagttc tctgtttctg gtgaaggatga aggtgatgct</b>	<b>180</b>
<b>acttaaggaa agcttactct caagttcatc tgcactactg gaaagcttcc agttccatgg</b>	<b>240</b>
<b>ccaactcttg ttactacttt cggatacggg gttcaatgct tcgctaggta tccagatcat</b>	<b>300</b>
<b>atgaggcagc acgatttctt caagtctgct atgccagagg gatatgttca agagaggact</b>	<b>360</b>
<b>atcttcttca aggatgatgg caactacaag actagggctg aggttaagtt cgagggatgat</b>	<b>420</b>
<b>actcttgatga acaggattga gcttaagggc atcgatttca aagaggatgg aacattctc</b>	<b>480</b>
<b>ggccacaagc ttgagtacaa ctacaattct cacaacgtgt acatcatggc tgataagcag</b>	<b>540</b>
<b>aagaacggca tcaagggttaa cttcaagatc aggcaaca tgcaggatgg atctgttcaa</b>	<b>600</b>
<b>cttgctgac attaccagca gaactactca attggagatg gaccagttct tcttcctgat</b>	<b>660</b>
<b>aaccactacc tttcttacca gtctgctctt tccaaggatc caaatgagaa gagggatcac</b>	<b>720</b>
<b>atggtgcttt tggagtttgt tactgctgct ggaatcactc ttggcatgga tgaactctac</b>	<b>780</b>
<b>aagtga</b>	<b>786</b>

<210> 4  
 15 <211> 261  
 <212> PROT  
 <213> Secuencia artificial

<220>  
 20 <223> Secuencia proteica de YFP-STOP

<400> 4

ES 2 588 482 T3

Met Gly Arg Gly Ser His His His His His His Lys Leu Pro Lys Lys  
1 5 10 15

Lys Arg Lys Val Tyr Leu Glu Met Val Ser Lys Gly Glu Glu Leu Phe  
20 25 30

Thr Gly Val Val Pro Ile Leu Val Glu Leu Asp Gly Asp Val Asn Gly  
35 40 45

His Lys Phe Ser Val Ser Gly Glu Gly Glu Gly Asp Ala Thr Gly Lys

ES 2 588 482 T3

50						55										60
Leu	Thr	Leu	Lys	Phe	Ile	Cys	Thr	Thr	Gly	Lys	Leu	Pro	Val	Pro	Trp	
65					70					75					80	
Pro	Thr	Leu	Val	Thr	Thr	Phe	Gly	Tyr	Gly	Val	Gln	Cys	Phe	Ala	Arg	
				85					90					95		
Tyr	Pro	Asp	His	Met	Arg	Gln	His	Asp	Phe	Phe	Lys	Ser	Ala	Met	Pro	
			100					105					110			
Glu	Gly	Tyr	Val	Gln	Glu	Arg	Thr	Ile	Phe	Phe	Lys	Asp	Asp	Gly	Asn	
		115					120					125				
Tyr	Lys	Thr	Arg	Ala	Glu	Val	Lys	Phe	Glu	Gly	Asp	Thr	Leu	Val	Asn	
	130					135					140					
Arg	Ile	Glu	Leu	Lys	Gly	Ile	Asp	Phe	Lys	Glu	Asp	Gly	Asn	Ile	Leu	
145					150					155					160	
Gly	His	Lys	Leu	Glu	Tyr	Asn	Tyr	Asn	Ser	His	Asn	Val	Tyr	Ile	Met	
				165					170					175		
Ala	Asp	Lys	Gln	Lys	Asn	Gly	Ile	Lys	Val	Asn	Phe	Lys	Ile	Arg	His	
			180					185					190			
Asn	Ile	Glu	Asp	Gly	Ser	Val	Gln	Leu	Ala	Asp	His	Tyr	Gln	Gln	Asn	
		195					200					205				
Thr	Pro	Ile	Gly	Asp	Gly	Pro	Val	Leu	Leu	Pro	Asp	Asn	His	Tyr	Leu	
	210					215					220					
Ser	Tyr	Gln	Ser	Ala	Leu	Ser	Lys	Asp	Pro	Asn	Glu	Lys	Arg	Asp	His	
225					230				235						240	
Met	Val	Leu	Leu	Glu	Phe	Val	Thr	Ala	Ala	Gly	Ile	Thr	Leu	Gly	Met	
				245					250					255		
Asp	Glu	Leu	Tyr	Lys												
				260												

<210> 5

<211> 25  
<212> ADN  
<213> Secuencia artificial  
<220>

5  
<223> Oligonucleótido  
<400> 5

10 tgaacagctc ctgccccttg ctcac 25

<210> 6  
<211> 25  
<212> ADN

15 <213> Secuencia artificial  
<220>  
<223> Oligonucleótido

20 <400> 6

tgaacagctc ctgccccttg ctcac 25

<210> 7  
25 <211> 25  
<212> ADN  
<213> Secuencia artificial

<220>  
30 <223> Oligonucleótido

<400> 7

gcaccacccc ggtgaacagc tcctc 25

35  
<210> 8  
<211> 25  
<212> ADN  
<213> Secuencia artificial

40  
<220>  
<223> Oligonucleótido

<400> 8

45 gtgagcaagg gcgaggagct gttca 25

<210> 9  
<211> 25  
50 <212> ADN  
<213> Secuencia artificial

<220>  
<223> Oligonucleótido

55  
<400> 9

cgccccttgct caccatctcg agaac 25

<210> 10  
 <211> 25  
 <212> ADN  
 5 <213> Secuencia artificial  
  
 <220>  
 <223> Oligonucleótido  
 10 <400> 10  
  
 caccaccccg gtgaacagct cctca 25  
  
 <210> 11  
 15 <211> 25  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial  
  
 <220>  
 20 <223> Oligonucleótido  
  
 <400> 11  
  
 accaccccg tgaacagctc ctca 25  
 25  
 <210> 12  
 <211> 25  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial  
 30  
 <220>  
 <223> Oligonucleótido  
  
 <400> 12  
 35  
 ccaccccggt gaacagctcc tcagc 25  
  
 <210> 13  
 <211> 25  
 40 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial  
  
 <220>  
 <223> Oligonucleótido  
 45  
 <220>  
 <221> misc\_característica  
 <222> (23) . . (23)  
 <223> n es a, c, g o t  
 50  
 <400> 13  
  
 gcaccacccc ggtgaacagc tcntc 25  
 55 <210> 14  
 <211> 25  
 <212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Oligonucleótido

5

<400> 14

gatgaactg agagtaagct ttccg 25

10 <210> 15

<211> 25

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

15 <220>

<223> Oligonucleótido

<400> 15

20 catgcatgca tgcgatgatg catgc 25

<210> 16

<211> 25

<212> ADN

25 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> Oligonucleótido

30 <400> 16

gatgaactta agtgaagtt taccg 25

<210> 17

35 <211> 25

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

40 <223> Oligonucleótido

<400> 17

gatgaactta agtgaagtt taccg 25

45

## REIVINDICACIONES

1. Un procedimiento para la alteración dirigida de una secuencia de ADN de doble cadena aceptora en un protoplasto vegetal que comprende una primera secuencia de ADN y una segunda secuencia de ADN que es complementaria a la primera secuencia de ADN, comprendiendo el procedimiento la combinación de la secuencia de ADN de doble cadena aceptora con un oligonucleótido donador en el que el oligonucleótido comprende al menos un dominio que es capaz de hibridar con 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 está ubicado a lo sumo a 2, preferiblemente a lo sumo a 1 nucleótido del extremo 3' de dicho oligonucleótido, más preferiblemente, dicho al menos un desapareamiento está en el extremo 3' del oligonucleótido.
2. Procedimiento según la reivindicación 1 en el que el nucleótido donador es complementario a la primera secuencia de ADN con la excepción de un desapareamiento.
3. Procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones previas en el que el oligonucleótido comprende al menos una sección que contiene al menos un nucleótido modificado seleccionado a partir del grupo compuesto por una modificación de una base, una modificación de una base del extremo 3' y/o 5', una modificación del esqueleto o una modificación de un azúcar.
4. Procedimiento según la reivindicación 3 en el que el nucleótido modificado tiene una afinidad de unión más alta en comparación con los nucleótidos A, C, T o G naturales con su nucleótido complementario, y en el que el nucleótido modificado se une con más fuerza a un nucleótido en la posición opuesta en la primera secuencia de ADN en comparación con un nucleótido natural complementario al nucleótido de la posición opuesta en la primera secuencia de ADN y/o en el que el nucleótido modificado es un nucleótido resistente a nucleasas.
5. Procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 3-4 en el que el nucleótido modificado se selecciona a partir del grupo compuesto por LNA o nucleótidos que tienen enlaces fosforotioato.
6. Procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones previas en el que el oligonucleótido comprende al menos dos, tres, cuatro o cinco nucleótidos modificados.
7. Procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones previas en el que el desapareamiento no es un nucleótido modificado.
8. Procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones previas en el que el nucleótido modificado está al menos a un nucleótido de el al menos un desapareamiento ubicado a lo sumo a 2, preferiblemente a lo sumo a 1 nucleótido del extremo 3' de dicho oligonucleótido, más preferiblemente, dicho al menos un desapareamiento está en el extremo 3' del oligonucleótido.
9. Procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones previas en el que el oligonucleótido alberga 2, 3 o 4 desapareamientos.
10. Procedimiento según una cualquiera de las reivindicaciones previas en el que la alteración es una delección, una sustitución y/o una inserción de al menos un nucleótido.
11. Procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones previas en el que el ADN de doble cadena aceptor procede de ADN genómico, ADN lineal, cromosomas artificiales vegetales, ADN cromosómico nuclear, ADN de orgánulos, ADN plasmídico o ADN episomal.
12. Procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones de procedimiento previas para corregir una mutación mediante el restablecimiento del tipo natural, inducir una mutación, inactivar una enzima mediante la interrupción de la región codificadora, modificar la bioactividad de una enzima mediante la alteración de la región codificadora o modificar una proteína mediante la interrupción de la región codificadora.
13. Uso de un oligonucleótido como se describe en cualquiera de las reivindicaciones 1-12 para la alteración dirigida de una secuencia de ADN de doble cadena aceptora en un protoplasto vegetal, preferiblemente para corregir una mutación mediante el restablecimiento del tipo natural, inducir una mutación, inactivar una enzima mediante la interrupción de la región codificadora, modificar la bioactividad de una enzima mediante la alteración de la región codificadora, modificar una proteína mediante la interrupción de la región codificadora, reparación del

desapareamiento, alteración dirigida del material genético vegetal, incluido mutación génica, reparación dirigida de genes o silenciamiento de genes.

14. Protoplasto vegetal que comprende:

5

- una secuencia de ADN de doble cadena aceptora que comprende una primera secuencia de ADN y una segunda secuencia de ADN que es complementaria a la primera secuencia de ADN, y

10 - un oligonucleótido en el que el oligonucleótido comprende al menos un dominio que es capaz de hibridar con 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 está ubicado a lo sumo a 2, preferiblemente a lo sumo a 1 nucleótido del extremo 3' de dicho oligonucleótido, más preferiblemente, dicho al menos un desapareamiento está en el extremo 3' del oligonucleótido.

**Figura 1.**

```

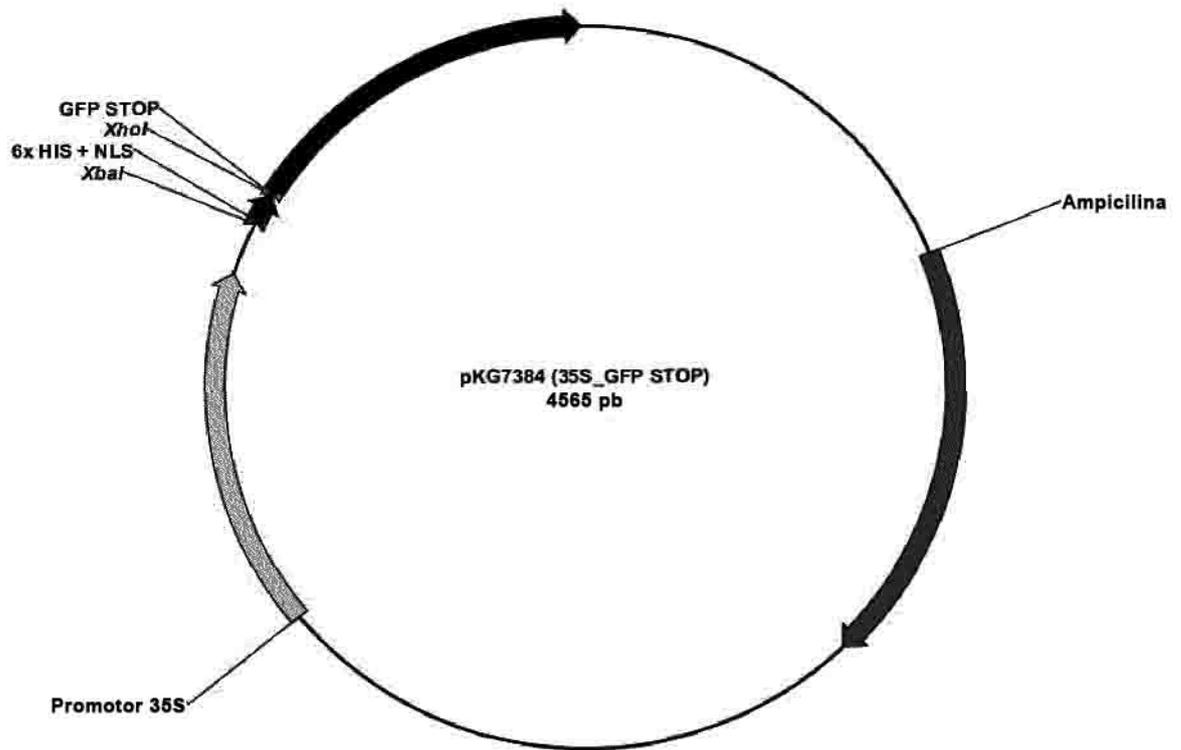
1      ATGGGAAGAG GATCGCATCA CCACCATCAT CATAAGCTTC CAAAGAAGAA GAGGAAGGT
60     TCTCGAGATG GTGAGCAAGG GCTAGGAGCT GTTCACCGGG GTGGTGCCCA TCCTGGTCG
120    AGCTGGACGG CGACGTAAAC GGCCACAAGT TCAGCGTGTG CCGCGAGGGC GAGGGCGAT
180    GCCACCTACG GCAAGCTGAC CCTGAAGTTC ATCTGCACCA CCGGCAAGCT GCCCGTGCC
240    CTGGCCCACC CTCGTGACCA CCCTGACCTA CGGCGTGCAG TGTTCAGCC 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

```

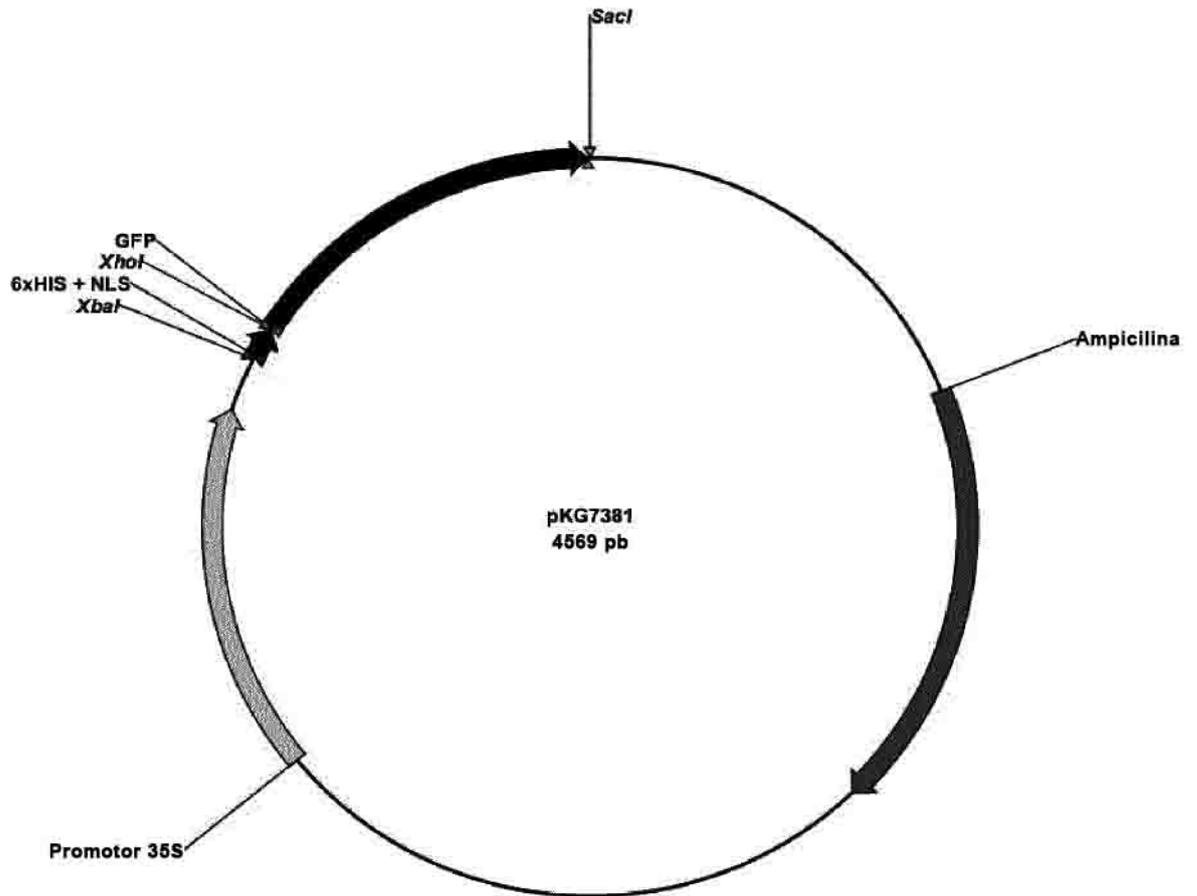
**Figura 2.**

```
1      MGRGSHHHHH HKLPKKKRKV LEMVSKG*EL FTGVVPILVE LDGDVNGHKF
51     SVSGEGEDA TYGKLTlkFI CTTGKLPVPW PTLVTTlTYG VQCFsRYPDH
101    MKQHDFfKSA MPEGYVQERT IFFKDDGNYK TRAEVKfEGD TLVNRIELKG
151    IDfKEDGNIL GHKLEYNyNS HNVYIMADKQ KNGIKVnFKI RHNIEDGSVQ
201    LADHYQqNTP IGDGPVllPD NHYLSTQsAL SKDPNEKRdH MVlLEfVTAA
251    GITLGMdELY K
```

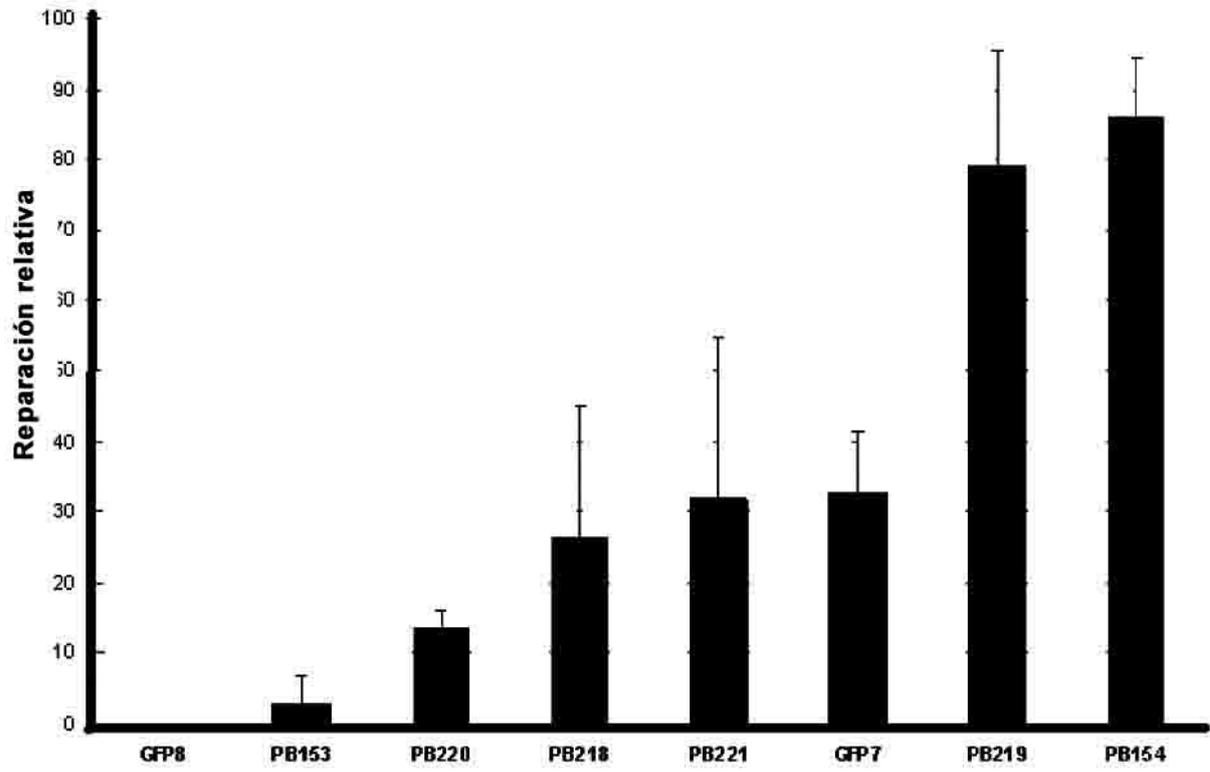
**Figura 3.**



**Fig 3. Continuación**



**Figura 4.**



**Figura 5.**

```

1      ATGGGAAGAG GATCGCATCA CCACCATCAT CATAAGCTTC CAAAGAAGAA 51
      GAGGAAGGTT CTCGAGATGG TTTCTAAGGG TGAGGAACTT TTCACTGGTG
101    TGGTTCCAAT TCTCGTTGAG CTTGATGGTG ATGTTAACGG ACACAAGTTC
151    TCTGTTTCTG GTGAAGGTGA AGGTGATGCT ACTTAAGGAA AGCTTACTCT
201    CAAGTTCATC TGCACTACTG GAAAGCTTCC 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    TCAAGGTAA CTTCAAGATC AGGCACAACA TCGAGGATGG ATCTGTTCAA
601    CTTGCTGATC ATTACCAGCA GAACACTCCA ATTGGAGATG GACCAGTTCT
651    TCTTCCTGAT AACCACTACC TTTCTTACCA GTCTGCTCTT TCCAAGGATC
701    CAAATGAGAA GAGGGATCAC ATGGTGCTTT TGGAGTTTGT TACTGCTGCT
751    GGAATCACTC TTGGCATGGA TGAACTCTAC AAGTGA

```

**Figura 6.**

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

Figura 7.

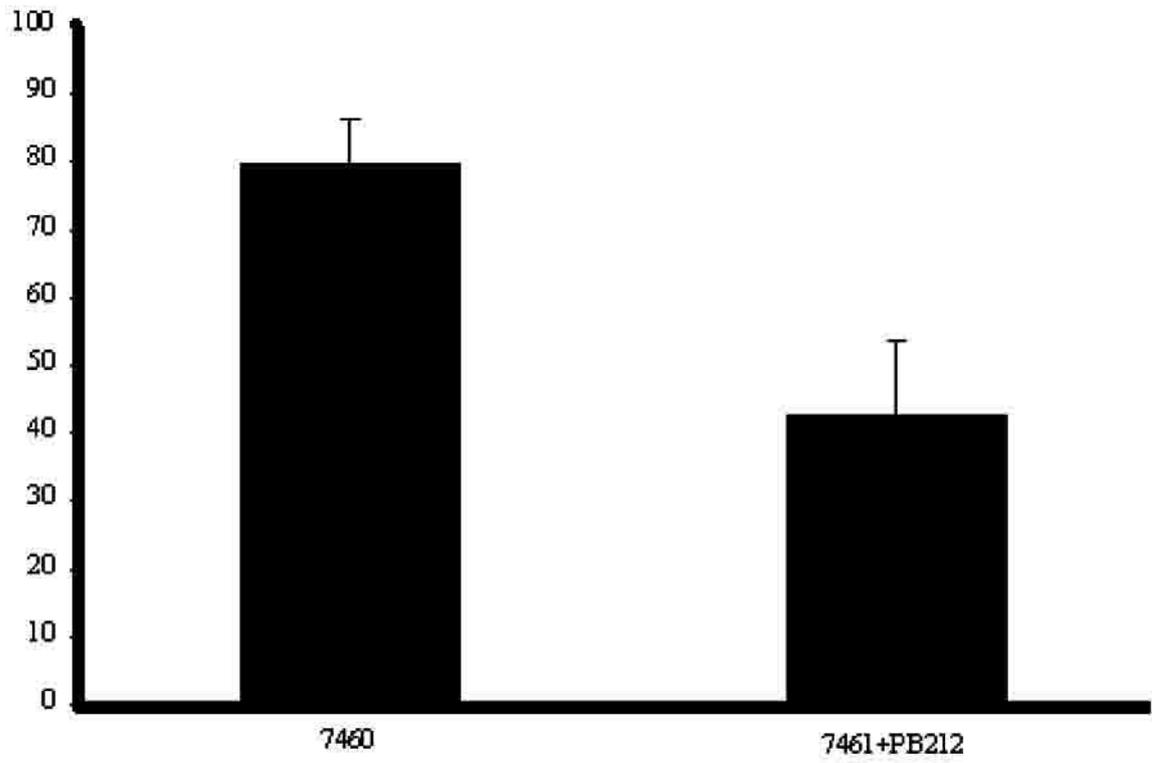


Figura 8

