

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 393 277**

51 Int. Cl.:

C12N 9/88 (2006.01)

C12N 15/10 (2006.01)

C12N 15/82 (2006.01)

C12Q 1/68 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **06835671 .6**

96 Fecha de presentación: **20.12.2006**

97 Número de publicación de la solicitud: **1963505**

97 Fecha de publicación de la solicitud: **03.09.2008**

54 Título: **Intercambio de nucleótidos seleccionados mejorado con oligonucleótidos modificados por propinilo**

30 Prioridad:

22.12.2005 WO PCT/NL2005/000884

09.05.2006 WO PCT/NL2006/000244

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:

20.12.2012

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:

20.12.2012

73 Titular/es:

KEYGENE N.V. (100.0%)

P.O. BOX 216

6700 AE WAGENINGEN, NL

72 Inventor/es:

BUNDOCK, PAUL;

DE BOTH, MICHEL THEODOOR JAN y

HOGERS, RENÉ CORNELIS JOSEPHUS

74 Agente/Representante:

TORNER LASALLE, Elisabet

ES 2 393 277 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

Intercambio de nucleótidos seleccionados mejorado con oligonucleótidos modificados por propinilo.

Campo de la invención

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

10 Antecedentes de la invención

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

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

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

Varios grupos han demostrado que también puede detectarse el TNE usando extractos de proteína total celular. Tales ensayos de búsqueda de actividad de TNE se denominan ensayos libres de células (Cole-Strauss y otros
55 1999 Nucleic Acids Res. 27: 1323-1330; Gamper y otros 2000 Nucleic Acids Res. 28, 4332-4339; Kmiec y otros 2001 Plant J. 27: 267-274; Rice y otros 2001 40: 857-868). El ensayo se configura como sigue. Se muta un plásmido que contiene dos genes bacterianos de resistencia a los antibióticos (kanamicina y carbenicilina) para que uno de los genes de resistencia a los antibióticos (por ejemplo, kanamicina) contenga un codón finalizador dentro del marco de lectura debido a la alteración de un solo nucleótido (por ejemplo, TAT a TAG). A continuación se incuba este plásmido mutado con proteína total celular y un oligonucleótido monocatenario diseñado para corregir el codón

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

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

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

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

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

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

Descripción de la invención

En las reivindicaciones adjuntas se dan a conocer realizaciones de la presente invención. Los presentes inventores han descubierto ahora que incorporando nucleótidos al oligonucleótido donador para el TNE que sean capaces de enlazarse con más fuerza al ADN aceptor que los correspondientes nucleótidos no modificados como A, C, T o G, la tasa del TNE puede aumentar significativamente. Sin restringirse con consideraciones teóricas, los presentes inventores creen que mediante la incorporación de nucleótidos modificados en el oligonucleótido donador, el oligonucleótido donador se enlaza con más fuerza al ADN aceptor y, por ende, aumenta la proporción del TNE. Los presentes inventores han descubierto que los oligonucleótidos que comprenden pirimidinas modificadas con propino 5 y/o purinas modificadas con propinilo C7 mejoran significativamente la eficacia del TNE.

Con este fin, se ha investigado el efecto del uso de oligonucleótidos que incorporan nucleósidos propinilados en la frecuencia del TNE en el sistema libre de células. Se comparó la actividad del TNE de tales oligonucleótidos con la actividad del TNE de oligonucleótidos compuestos de ADN normal. Se encontró que los oligonucleótidos que contenían pirimidinas de propino C5 y/o purinas de propino C7 aumentaban la eficacia del TNE tanto para sustituciones como para inserciones en el ensayo libre de células hasta un nivel no observado hasta el momento.

Los oligonucleótidos que contenían nucleótidos propinilados eran hasta 10 veces más eficaces en el ensayo libre de células en comparación con los oligonucleótidos compuestos de ADN normal. También se halló que la eficacia del TNE podía mejorar más aumentando el número de nucleótidos propinilados en el oligonucleótido y, además, que la mejora observada era independiente del *lucifer*, indicando que los oligonucleótidos que contenían pirimidinas de propino C5 y/o purinas de propino C7 son capaces de proporcionar frecuencias mejoradas de TNE de una manera independiente de la especie, como en células vegetales y animales.

La presente divulgación se basa, así, en la consideración dada a conocer de que el intercambio de nucleótidos seleccionados deseado puede lograrse mediante el uso de oligonucleótidos de pirimidinas modificadas (parcialmente) con propino C5 y/o de purinas modificadas con propino C7. La ubicación, el tipo y la cantidad de modificación (es decir, el estado) del oligonucleótido pueden variarse, tal como se dará a conocer en lo que sigue en el presente documento.

Así, la presente divulgación, en un aspecto, proporciona oligonucleótidos (de pirimidina (plenamente) modificada con propino C5 y/o purinas modificadas con propino C7). Los oligonucleótidos mc modificados pueden ser usados para introducir cambios genéticos específicos en células vegetales, animales o humanas. La divulgación es aplicable en los campos de la investigación biomédica, la agricultura y para construir plantas y animales, incluyendo seres humanos, mutados específicamente. La divulgación también es aplicable en el campo de la medicina y de la terapia génica.

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

Otro aspecto de la divulgación reside en un procedimiento para la alteración seleccionada de una cadena de ADN parental (primera cadena, segunda cadena) poniendo en contacto el doblete de ADN parental con un oligonucleótido que contenga al menos un nucleótido discrepante en comparación con la cadena parental, conteniendo el oligonucleótido donador una sección que está modificada con pirimidinas sustituidas con propino C5 y/o purinas sustituidas con propino C7 para que tenga una mayor capacidad de enlace que la cadena parental (aceptora) en presencia de proteínas que sean capaces de intercambio de nucleótidos seleccionados.

Así, el quid de la divulgación se encuentra en la mejora en la capacidad de enlace del oligonucleótido intercalante (a veces denominado donador) con oligonucleótidos mc modificados con propino con respecto al oligonucleótido intercalante no modificado.

Descripción detallada de la divulgación

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

Preferentemente, la discrepancia en el dominio es con respecto a la primera secuencia de ADN. El oligonucleótido comprende una sección que está modificada (contiene pirimidina modificada con propino C5 y/o purinas modificadas con propino C7) para que tenga una mayor afinidad de enlace que la (parte correspondiente de la) segunda secuencia de ADN.

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

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

En ciertas realizaciones, el oligonucleótido comprende una sección que contiene al menos uno, preferentemente al menos 2, más preferentemente al menos tres nucleótidos modificados con propino. En ciertas realizaciones, la sección sobre el oligonucleótido puede contener más de 4, 5, 6, 7, 8, 9 o 10 nucleótidos modificados con propino. En ciertas realizaciones, la sección está completamente modificada, es decir, todas las pirimidinas del oligonucleótido portan una sustitución con propino C5 y/o todas las purinas portan una sustitución con propino C7. En ciertas realizaciones, al menos el 10% de los nucleótidos del oligonucleótido está sustituido con su homólogo propinilado. En ciertas realizaciones, al menos el 25%, más preferentemente al menos el 50%, aún más preferentemente al menos el 75% y en algunos casos se prefiere que al menos el 90% de los nucleótidos estén sustituidos por sus homólogos propinilados.

- 5
- 10
- 15
- En ciertas realizaciones, puede introducirse más de una discrepancia, ya sea simultánea o sucesivamente. El oligonucleótido puede acomodar más de una discrepancia en ubicaciones ya sean adyacentes o separadas en el oligonucleótido. En ciertas realizaciones, el oligonucleótido puede comprender dos, tres, cuatro o más nucleótidos discrepantes que pueden ser adyacentes o remotos (es decir, no adyacentes). El oligonucleótido puede comprender dominios y secciones adicionales para acomodar esto y, en particular, puede comprender varias secciones. En ciertas realizaciones, el oligonucleótido puede incorporar un inserto potencial que ha de ser insertado en la cadena aceptora. Tal inserto puede variar en longitud desde más de 5 nucleótidos hasta 100. De forma similar, en ciertas realizaciones, pueden introducirse deleciones de variaciones de longitudes similares (de 1 a 100 nucleótidos).

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

- 20
- 25
- 30
- 35
- determinando la secuencia de la cadena aceptora, o al menos de una sección de la secuencia en torno al nucleótido que ha de intercambiarse. Normalmente, esto puede estar en el orden de al menos 10, preferentemente 15, 20, 25 o 30 nucleótidos adyacentes a la discrepancia, preferentemente a cada lado de la discrepancia (por ejemplo, GGGGGGXGGGGG, siendo X la discrepancia);
 - diseñando un oligonucleótido donador que sea complementario de una o ambas secciones adyacentes a la discrepancia y contenga el nucleótido deseado que ha de ser intercambiado (por ejemplo CCCCCYCCCCC);
 - proporcionando (por ejemplo, por síntesis) el oligonucleótido con las modificaciones con propino en las posiciones deseadas. Las modificaciones pueden variar mucho, dependiendo de las circunstancias. Ejemplos son $C^mC^mC^mC^mC^mYC^mC^mC^mC^mC^m$, $C^mCC^mCC^mCYC^mCC^mCC^mC$, $CCCCCYC^mC^mC^mC^mC^m$, $C^mC^mC^mC^mC^mYCCCCC$, $CCCCCYC^mCCCCC$, $C^mCCCCCYC^mCCCCC$, $C^mCCCCCYCCCCC^m$, $C^mCCCCCYCCCCC$, etcétera, representando C^m un resto nucleótido modificado con propino. Para una secuencia aceptora diferente, por ejemplo ATGCGTACXGTCCATGAT, pueden diseñarse correspondientes oligonucleótidos donadores, por ejemplo TACGCATGYCAGGTACTA, con una modificación tan variable como se ha esbozado anteriormente en el presente documento;
 - sometiendo el ADN que ha de modificarse con el oligonucleótido donador en presencia de proteínas que sean capaces de intercambio de nucleótidos seleccionados, por ejemplo, y en particular, a proteínas que sean funcionales en el mecanismo celular de reparación de discrepancias.

40

45

Sin la restricción de consideraciones teóricas, se cree que la afinidad mejorada de enlace aumenta la probabilidad de que un oligonucleótido encuentre su diana y permanezca unido a ella, mejorando así la eficacia del TNE. Muchas modificaciones químicas diferentes del esqueleto o la base del azúcar confieren una afinidad de enlace mejorada. Sin embargo, los presentes inventores decidieron centrarse en oligonucleótidos modificados con propino. Los oligonucleótidos que contienen nucleótidos de pirimidina con un grupo propinilo en la posición C5 forman dobletes y tripletes más estables que sus correspondientes derivados de pirimidina. Las purinas con el mismo sustituyente de propino en la posición 7 forman dobletes aún más estables y son por ello preferidas. Así, en ciertas realizaciones preferentes, la eficacia aumentó más mediante el uso de nucleótidos de purina de 7-propinilo (derivados 7-propinilo de 8-aza-7-deaza-2'-deoxiguanosina y 8-aza-7-deaza-2'-deoxiadenina), que mejoran la afinidad de enlace hasta un grado aún mayor que los nucleótidos de pirimidina de propino C5. Tales nucleótidos son dados a conocer, *inter alia*, en He y Seela, 2002 Nucleic Acids Res. 30: 5485-5496.

50

55

Un grupo propinilo es una cadena de tres carbonos con un triple enlace. El triple enlace está ligado de forma covalente a la estructura básica del nucleótido, que se sitúa en la posición C⁵ de la pirimidina y en la posición 7 del nucleótido de purina (Fig. 2). Tanto la citosina como la timidina pueden ser equipadas con un grupo propinilo C5, dando como resultado C5-propinilcitosina y C5-propiniltimidina, respectivamente. Un solo resto de C5-propinilcitosina aumenta la T_m en 2,8°C; un solo resto de C5-propiniltimidina en 1,7°C (Froehler y otros 1993 Tetrahedron Letters 34: 1003-6; Lacroix y otros 1999 Biochemistry 38: 1893-1901; Ahmadian y otros 1998 Nucleic Acids Res. 26: 3127-3135; Colucci y otros 1994 J. Am. Chem. Soc 116: 785-786). Esto se atribuye a la naturaleza hidrófoba de los grupos 1-propino en la posición C5 y también permite mejor apilamiento de las bases, dado que el grupo propino es plano con respecto a la base heterocíclica.

60

Las propiedades mejoradas de enlace de los oligonucleótidos que contienen grupos pirimidina sustituidos con propino C5 han sido aprovechadas para alterar un proceso celular. Un oligonucleótido antisentido que contenga grupos propino C5 forma un doblete más estable con su ARNm diana, lo que lleva a un aumento en la inhibición de la expresión de genes (Wagner y otros 1993 Science 260: 1510-1513; Flanagan y otros 1996 Nature Biotech. 14: 1139-1145; Meunier y otros 2001 Antisense & Nucleic Acid Drug Dev. 11: 117-123). Además, estos experimentos

demuestran que tales oligonucleótidos son biológicamente activos y que pueden ser tolerados por la célula. En la técnica sobre el TNE, la modificación de pirimidinas con propino C5 ha sido enumerada en una lista de posibles modificaciones de oligonucleótidos como alternativas de las moléculas químéricas usadas en el TNE. Sin embargo, no hay indicación alguna en la técnica hasta ahora que sugiera que los oligonucleótidos de ADN monocatenario modificado con propino C5 mejore significativamente la eficacia del TNE hasta el extremo descubierto ahora.

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

Tal como se usa en el presente documento, la capacidad del oligonucleótido donador de influir en el TNE depende del tipo, la ubicación y la cantidad de nucleótidos modificados que se incorporen en el oligonucleótido donador. Esta capacidad puede ser cuantificada, por ejemplo, normalizando la afinidad de enlace (o la energía de enlace (energía libre de Gibbs)) entre nucleótidos convencionales en 1, es decir, para los enlaces tanto AT como GC, la afinidad de enlace se normaliza en 1. Para los oligonucleótidos de la presente invención, la afinidad relativa de enlace (RBA) de cada nucleótido modificado es > 1 . Esto se ejemplifica en una fórmula a continuación:

$$RBA = \sum_n^i RBA(\text{modificado}) - \sum_m^i RBA(\text{no modificado}) > 0,$$

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

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

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

Los oligonucleótidos donadores según la divulgación pueden contener modificaciones adicionales para mejorar las características de hibridación, de forma que el donador presente una mayor afinidad hacia la cadena de ADN diana para que la intercalación del donador resulte más fácil. El oligonucleótido donador también puede ser modificado adicionalmente para que se vuelva más resistente a las nucleasas, para estabilizar la estructura triple o cuádruple. La modificación de oligonucleótidos donadores de pirimidina sustituida con propino C5 puede comprender la modificación con fosforotioato, sustituciones de 2-OMe, el uso de ANB (ácidos nucleicos bloqueados), APN (ácidos peptidonucleicos), ribonucleótidos y otras bases que modifiquen, preferentemente mejoren, la estabilidad del híbrido entre el oligonucleótido y la cadena aceptora.

Particularmente útiles entre tales modificaciones son los APN, que son análogos de oligonucleótidos en los que el esqueleto de desoxirribosa del oligonucleótido es sustituido por un esqueleto peptídico. Se construye un esqueleto peptídico de ese tipo de unidades de repetición de N-(2-aminoetil) glicina ligadas a través de enlaces amida. Cada subunidad de esqueleto peptídico está unida a una nucleobase (también denominada "base"), que puede ser una base presente de manera natural, no presente de manera natural o modificada. Los oligómeros de APN se enlazan específicamente a una secuencia de ADN o ARN complementarios con mayor afinidad que tanto el ADN como el ARN. En consecuencia, los dobles resultantes de APN/ADN o APN/ARN tienen temperaturas de fusión (T_m) mayores. Además, la T_m de los dobles de APN/ADN o APN/ARN es mucho menos sensible a la concentración de sal que los dobles de ADN/ADN o ADN/ARN. El esqueleto de poliamida de los APN también es más resistente a la

degradación enzimática. Se describe la síntesis de los APN, por ejemplo, en los documentos WO 92/20702 y WO 92/20703. Se ilustran otros APN, por ejemplo, en el documento WO93/12129 y en la patente estadounidense nº 5.539.082, expedida el 23 de julio de 1996. Además, muchas publicaciones científicas describen la síntesis de los APN, así como sus propiedades y usos. Véanse, por ejemplo, Patel, Nature, 1993, 365, 490; Nielsen y otros, Science, 1991, 254, 1497; Egholm, J. Am. Chem. Soc., 1992, 114, 1895; Knudson y otros, Nucleic Acids Research, 1996, 24, 494; Nielsen y otros, J. Am. Chem. Soc., 1996, 118, 2287; Egholm y otros, Science, 1991, 254, 1497; Egholm y otros, J. Am. Chem. Soc., 1992, 114, 1895; y Egholm y otros, J Am. Chem. Soc., 1992, 114, 9677.

También hay modificaciones útiles adicionales de los oligonucleótidos de pirimidina sustituida con propino C5 de la presente invención conocidas como Súper A y Súper T, obtenibles en Epoch Biosciences, Alemania. Estos nucleótidos modificados contienen un sustituyente adicional que se adhiere en el surco principal del ADN, en el que se cree que mejora el apilamiento de bases en el doblete de ADN. Véase también la Fig. 4.

Modificaciones útiles adicionales también incluyen uno o más monómeros de la clase de moléculas sintéticas conocidas como ácidos nucleicos bloqueados (ANB). Los ANB son análogos de nucleósidos y nucleótidos bicíclicos y tricíclicos y los oligonucleótidos que contienen tales análogos. Las características estructurales y funcionales básicas de los ANB y sus análogos relacionados se exponen en diversas publicaciones y patentes, incluyendo WO 99/14226, WO 00/56748, WO00/66604, WO 98/39352, la patente estadounidense nº 6.043.060 y la patente estadounidense nº 6.268.490.

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

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

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

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

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

En un aspecto, la divulgación se refiere a un procedimiento para la alteración seleccionada de una secuencia de ADN aceptor bicatenario que comprende la combinación de la secuencia de ADN aceptor bicatenario con un oligonucleótido donador, conteniendo la secuencia de ADN aceptor bicatenario una primera secuencia de ADN y una segunda secuencia de ADN que es el complemento de la primera secuencia de ADN, y comprendiendo el oligonucleótido donador un dominio que comprende al menos una discrepancia con respecto a la secuencia de ADN aceptor bicatenario que ha de ser alterada, preferentemente con respecto a la primera secuencia de ADN, y modificándose una sección del oligonucleótido donador con pirimidinas sustituidas con propinilo C5 para expresar un mayor grado de afinidad con la primera secuencia de ADN en comparación con un nucleótido no modificado en esa posición del oligonucleótido y/o estando metilada la segunda secuencia de ADN con un grado de metilación menor que la correspondiente sección del oligonucleótido donador, en presencia de proteínas que sean capaces de intercambio de nucleótidos seleccionados.

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

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

5 La divulgación también versa sobre el uso de oligonucleótidos, esencialmente tal como se describe en lo que antecede del presente documento, para alterar una célula, corregir una mutación mediante la restauración a la forma natural, inducir una mutación, desactivar una enzima mediante alteración de la región codificante, modificar la bioactividad de una enzima alterando la región codificante, modificar una proteína alterando la región codificante, reparación de discrepancias, alteración seleccionada de material genético (vegetal), incluyendo mutación de genes, 10 reparación de genes seleccionados y bloqueo de genes.

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

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

La divulgación versa en particular acerca del uso del procedimiento de TNE usando los oligonucleótidos modificados con propino de la invención para proporcionar resistencia a los herbicidas en plantas. En particular, la divulgación versa acerca de plantas que han sido dotadas de resistencia a los herbicidas, en particular la kanamicina, glifosato 20 y/o carbenicilina.

Descripción de las figuras

Figura 1: Representación esquemática del intercambio de nucleótidos seleccionados. Se pone en contacto una cadena de ADN bicatenario aceptor que contiene un nucleótido (X) que ha de intercambiarse con un oligonucleótido donador de pirimidina modificada con propino C5 (dado esquemáticamente como NNN^mNNN^mYNN^mNN^m) que 25 contiene el nucleótido (Y) que ha de insertarse. La estructura triple es sometida a un entorno, o puesta en contacto con el mismo, que es capaz de TNE o, al menos, con proteínas que son capaces de llevar a cabo el TNE, tales como las conocidas como la mezcla de enzimas libre de células o un extracto libre de células (véanse, *inter alia*, los documentos WO99/58702, WO01/73002).

Figura 2: Estructuras químicas de 5-propinil-deoxitimidina, 5-propinil-deoxicitosina, 2'-deoxi-7-propinil-7-deaza-adenosina y 2'-deoxi-7-propinil-deaza-guanosina. 30

Figura 3: La eficacia de reparación por TNE de oligonucleótidos que contienen nucleótidos de pirimidina de propino C5 según se miden usando el ensayo libre de células. Para cada experimento se determinó la eficacia de la reparación usando el oligonucleótido de ADN normal y se fijó en un valor de 1. El número de aumentos indica el incremento en reparación visto usando oligonucleótidos que contienen pirimidina de propino C5 en comparación con 35 la eficacia de reparación obtenida cuando se usa el oligonucleótido de ADN normal. Se obtuvieron resultados similares usando purinas propiniladas.

Ejemplo

Materiales y procedimientos

40 Se compraron en Trilink Biotech o GeneLink oligonucleótidos que contenían pirimidinas de propino C5. Las secuencias de los oligos usados se muestran a continuación. El plásmido usado en los experimentos fue un derivado de pCR2.1 (Invitrogen) que contiene genes que confieren resistencia tanto a la kanamicina como a la carbenicilina. Se introdujeron codones finalizadores y deleciones dentro del marco de lectura en la kanamicina y la carbenicilina según se ha descrito previamente (Sawano y otros 2000 *Nucleic Acids Res.* 28: e78). El plásmido KmY22stop tiene una mutación de TAT a TAG en el codón Y22 en el ORF de la kanamicina, mientras que el 45 plásmido CbY44stop tiene una conversión de TAC a TAG en el codón Y44 en el ORF de la carbenicilina. En el plásmido KmY22, se deleciónó el tercer nucleótido del codón Y22 (TAT), dando un desplazamiento en el marco de lectura.

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

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

```

KmY22Δ   GAG AGG CTA TTC GGC TA_ GAC TGG GCA CAA CAG
          E   R   L   F   G   *
Cb WT    GGT GCA CGA GTG GGT TAC ATC GAA CTG GAT CTC
          G   A   R   V   G   Y   I   E   L   D   L
5 CbY44stop GGT GCA CGA GTG GGT TAG ATC GAA CTA GAT CTC
          G   A   R   V   G   *
    
```

Oligo	Secuencia	% de grupos propinilo	ID SEC
K1	tgtgccagtygzagccgaatagc	8	1
K2	tgtgyyyagtygtagyygaatagy	29	2
K3	zgzgccagzcgzagccgaazagc	20	3
K4	zgzgyyyagzygzagyygaazagy	50	4
C4	aygagzgggzatazygaayzgga	33	5

Se muestran la secuencia relevante de los marcos de lectura de la kanamicina y la carbenicilina y los aminoácidos codificados. Se introdujeron las mutaciones de un solo nucleótido que producen un codón finalizador (TAG, *) según se ha descrito anteriormente (Sawano y otros 2000 Nucleic Acids Res. 28: e78). Se muestran las secuencias de los oligonucleótidos usados en los experimentos. Los oligonucleótidos K1-K4 se usaron para reparar el KmY22stop y la mutación KmY22Δ a un codón alternativo codificante de tirosina (TAC). De manera similar, se usó el oligonucleótido C1 para cambiar la mutación CbY44 (TAG) al codón alternativo de tirosina (TAT). Se subraya el nucleótido discrepante en cada oligonucleótido. Se indican los nucleótidos derivados del propino (Y=5-propinilo-deoxicidina, Z=5-propinilo-deoxiuracilo). Se subrayan las regiones de enlace de oligonucleótidos en los ORF de la kanamicina y la carbenicilina. Los oligonucleótidos K1-K4 son complementarios de la secuencia de codificación de la kanamicina, mientras que C1 es complementario de la cadena no codificante de la carbenicilina.

Los ensayos libres de células se llevaron a cabo como sigue. Se recogieron yemas florales de *Arabidopsis thaliana* (ecotipo Col-0) y se molieron en atmósfera de nitrógeno. Se añadieron 200 µl de tampón de aislamiento de proteínas (20 mM HEPES pH 7,5, 5 mM KC1, 1,5 mM MgCl₂, 10mM DTT, 10% (v/v) glicerol, 1% (w/v) PVP). Se pelletizaron los restos vegetales mediante centrifugación a 14k RPM durante 30 minutos y se almacenó el sobrenadante a -80°C. Se midió la concentración de proteínas usando el *kit* NanoOrange (Molecular Probes, Inc.). Un aislamiento típico dio como resultado una concentración de proteínas de aproximadamente 3-4 µg/µl. Las reacciones libres de células contenían los componentes siguientes: 1 µg ADN plasmídico (KmY22stop o CbY44stop), 100 ng de oligonucleótido, 30 µg de proteína vegetal total, 4 µl de ADN de esperma cizallado de salmón (3 µg/µl), 2 µl de mezcla inhibidora de proteasas (conc. 50×: comprimidos Complete de cóctel inhibidor de proteasas libre de EDTA, Roche Diagnostics), 50 µl de tampón de reacción 2× libre de células (400 mM Tris pH 7,5, 200 mM MgCl₂, 2 mM DTT, 0,4mM espermidina, 50 mM ATP, 2 mM de cada uno de CTP, GTP, UTP, 0,1 mM de cada uno de dNTP Y 10 mM NAD) compensados con agua hasta un volumen total 100 µl. Se incubó la mezcla a 37°C durante 1 hora. Después se aisló como sigue el ADN plasmídico. Se añadieron 100 µl de H₂O a cada reacción para aumentar el volumen, seguido por 200 µl de fenol con tampón alcalino (pH 8-10). Esto se sometió brevemente a agitación vorticial y luego se centrifugó a 13k rpm durante 3 minutos. Se transfirió la fase superior acuosa a un nuevo tubo y se añadieron entonces 200 µl de cloroformo. Esto fue sometido brevemente a agitación vorticial, centrifugado a 13k rpm durante 3 minutos y la fase acuosa se transfirió a un nuevo tubo. Se precipitó el ADN mediante la adición de 0,7 volúmenes de 2-propanol y la perla fue resuspendida en TE. Para eliminar cualquier oligonucleótido copurificado, se hizo pasar el ADN por una columna de purificación de PCR Qiagen y se eluyó el ADN plasmídico en un volumen final de 30 µl. Se electroporaron 2µl de ADN plasmídico en 18 µl de células electrocompetentes DH10B (Invitrogen). Después de la electroporación, se permitió que las células se recuperaran en un medio de SOC durante 1 hora a 37°C. Después de este periodo, para los experimentos que usaban KmY22stop y KmY22, se añadió kanamicina hasta una concentración de 100 µg/ml y las células fueron incubadas durante 3 horas adicionales. Para los experimentos que usaban CbY44stop, las células fueron cultivadas en placas directamente sobre un medio sólido después del periodo de recuperación. El medio sólido contenía 100 µg/ml de kanamicina o carbenicilina. Para los experimentos con KmY22stop y KmY22, se detectó el número de eventos de TNE sobre el medio de kanamicina y se calculó la eficacia de electroporación contando el número de colonias obtenidas a partir de una disolución de 10⁻⁴ y 10⁻⁵ de la electroporación dispuesta en placas sobre el medio de carbenicilina. Para los experimentos realizados usando CbY44stop, se invirtieron estas condiciones de selección. Se calculó la eficacia del TNE dividiendo el número de eventos de TNE por el número total de células transformadas.

Resultados

Los oligonucleótidos fueron diseñados para producir una única sustitución de nucleótido en el codón finalizador (TAG) introducido en los ORF de la kanamicina o la carbenicilina de KmY22stop y CbY44stop para que el codón codifique nuevamente el aminoácido correcto. En el plásmido KmY22, los oligonucleótidos fueron diseñados para añadir un único nucleótido, restaurando así el ORF. Para establecer el número óptimo de pirimidinas de propino C5, se creó una serie de oligonucleótidos. El oligo K1 contiene dos pirimidinas de propino C5 que flanquean el nucleótido discrepante. En el oligo K2, todos los nucleótidos de citosina están sustituidos por '5-propinilo-deoxicidina. En el oligo K3, todos los nucleótidos de timidina están sustituidos por 5-propinilo-deoxiuracilo. En los oligos K4 y C4, todas las pirimidinas están sustituidas por pirimidinas de propino C5. En cada experimento se usaron en paralelo oligonucleótidos de ADN no modificados y oligonucleótidos modificados con propino C5. En cada experimento, se estableció arbitrariamente como 1 la eficacia del TNE obtenida usando el oligonucleótido de ADN normal, y la eficacia del TNE de los oligonucleótidos modificados con propino C5 fue expresada subsiguientemente como un número de aumentos con respecto al oligonucleótido de ADN normal. Tal como se muestra en la Figura 3, los oligonucleótidos modificados con propino C5 funcionaron más eficazmente que el ADN normal en el ensayo de los inventores. Aumentó la eficacia tanto de sustituciones como de inserciones. La eficacia total de reparación de las sustituciones fue mayor que la de las inserciones. La mejora que se observa depende del porcentaje de nucleótidos de propino C5 presentes. Los oligonucleótidos (24meros) que contienen 2 (K1), 7 (K2) o 5 (K3) pirimidinas de propino C5 muestran todos un aumento de 2-3 con respecto a los oligonucleótidos del ADN. Sin embargo, el mayor aumento en la eficacia de reparación (6-10 veces) se observa usando oligonucleótidos en los que la totalidad de los 12 nucleótidos de pirimidina es sustituida por pirimidinas de propino C5 (K4 y C4). Es importante hacer notar que este efecto no está limitado únicamente a la reparación en KmY22, ya que la reparación del codón finalizador en CbY44 también mejora cuando se usan oligonucleótidos modificados con propino C5.

Se purificaron los plásmidos a partir de colonias en las que los inventores dieron por sentado que había ocurrido la conversión del codón finalizador, y los genes de resistencia a los antibióticos fueron secuenciados subsiguientemente para confirmar que los codones de finalización habían sido alterados realmente.

Así, se descubrió que los oligonucleótidos que contienen nucleótidos de pirimidina de propino C5 han mejorado las propiedades no codificantes. Se demostró que, usando un ensayo de TNE *in vitro*, el sistema libre de células, los oligonucleótidos que contienen nucleótidos de pirimidina de propino C5 muestran, efectivamente, mayores niveles de TNE en comparación con la eficacia del TNE obtenida usando oligonucleótidos de ADN normal. Esta mejora puede ser de hasta 10 veces, y es independiente de la secuencia del oligonucleótido o del *locus* que ha de ser alterado. Esta mejora se hizo mayor seleccionando secuencias ricas en pirimidina para maximizar el porcentaje de los nucleótidos de pirimidina de propino C5. La eficiencia también aumentó mediante el uso de nucleótidos de purina de 7-propinilo, que mejoran la afinidad de enlace hasta un grado aún mayor que los nucleótidos de pirimidina de propino C5 (He & Seela, 2002 Nucleic Acids Res. 30: 5485-5496). Combinando las purinas y las pirimidinas de propino permite la producción de oligonucleótidos en los que todos los nucleótidos portan grupos propinilo en las bases.

LISTADO DE SECUENCIAS

<110> Keygene NV
 <120> Intercambio de nucleótidos seleccionados mejorado con oligonucleótidos modificados con propinilo
 <130> P27711PC02
 <150> PCT/NL2005/000884
 <151> 2005-12-22
 <150> PCT/NL2006/000244
 <151> 2006-05-09
 <160> 5
 <170> PatentIn versión 3.3
 <210> 1
 <211> 24
 <212> ADN
 <213> Artificial
 <220>
 <223> oligonucleótido modificado Y=5-propinilo-deoxicidina, Z=5-propinilo-deoxiuracilo
 <220>
 <221> base_modificada
 <222> (11)..(11)
 <223> 5-propinilo-deoxicidina
 <220>
 <221> base_modificada

<222> (13)..(13)
 <223> 5-propinilo-deoxiuracilo
 <400> 1
 tgtgccagcgt cgtagccgaa tagc 24
 5 <210> 2
 <211> 24
 <212> ADN
 <213> Artificial
 <220>
 10 <223> Oligonucleótido modificado, Y=5-propinilo-deoxicitidina, Z=5-propinilo-deoxiuracilo
 <220>
 <221> base_modificada
 <222> (5)..(7)
 <223> 5-propinilo-deoxicitidina
 15 <220>
 <221> base_modificada
 <222> (11)..(11)
 <223> 5-propinilo-deoxicitidina
 <220>
 20 <221> base_modificada
 <222> (16)..(17)
 <223> 5-propinilo-deoxicitidina
 <220>
 25 <221> base_modificada
 <222> (24)..(24)
 <223> 5-propinilo-deoxicitidina
 <400> 2
 tgtgccagcgt cgtagccgaa tagc 24
 30 <210> 3
 <211> 24
 <212> ADN
 <213> Artificial
 <220>
 <223> Oligonucleótido modificado, Z=5-propinilo-deoxiuracilo
 35 <220>
 <221> base_modificada
 <222> (1)..(1)
 <223> 5-propinilo-deoxiuracilo
 <220>
 40 <221> base_modificada
 <222> (3)..(3)
 <223> 5-propinilo-deoxiuracilo
 <220>
 45 <221> base_modificada
 <222> (10)..(10)
 <223> 5-propinilo-deoxiuracilo
 <220>
 50 <221> base_modificada
 <222> (13)..(13)
 <223> 5-propinilo-deoxiuracilo
 <220>
 <221> base_modificada
 <222> (21)..(21)
 <223> 5-propinilo-deoxiuracilo
 55 <400> 3
 tgtgccagcgt cgtagccgaa tagc 24
 <210> 4

<211> 24
 <212> ADN
 <213> Artificial
 <220>
 5 <223> oligonucleótido modificado
 <220>
 <221> base_modificada
 <222> (1)..(1)
 <223> 5-propinilo-deoxiuracilo
 10 <220>
 <221> base_modificada
 <222> (3)..(3)
 <223> 5-propinilo-deoxiuracilo
 15 <220>
 <221> base_modificada
 <222> (5)..(7)
 <223> 5-propinilo-deoxicitidina
 20 <220>
 <221> base_modificada
 <222> (10)..(10)
 <223> 5-propinilo-deoxiuracilo
 25 <220>
 <221> base_modificada
 <222> (11)..(11)
 <223> 5-propinilo-deoxicitidina
 30 <220>
 <221> base_modificada
 <222> (13)..(13)
 <223> 5-propinilo-deoxiuracilo
 35 <220>
 <221> base_modificada
 <222> (16)..(17)
 <223> 5-propinilo-deoxicitidina
 40 <220>
 <221> base_modificada
 <222> (21)..(21)
 <223> 5-propinilo-deoxiuracilo
 45 <220>
 <221> base_modificada
 <222> (24)..(24)
 <223> 5-propinilo-deoxicitidina
 <400> 4
 tgtgccagc cgtagccgaa tagc 24
 <210> 5
 <211> 24
 <212> ADN
 <213> Artificial
 <220>
 <223> oligonucleótido modificado
 50 <220>
 <221> base_modificada
 <222> (2)..(2)
 <223> 5-propinilo-deoxicitidina
 55 <220>
 <221> base_modificada
 <222> (6)..(6)
 <223> 5-propinilo-deoxiuracilo

5
5
10
15
20

<220>
<221> base_modificada
<222> (10)..(10)
<223> 5-propinilo-deoxiuracilo

<220>
<221> base_modificada
<222> (11)..(11)
<223> 5-propinilo-deoxiuracilo

<220>
<221> base_modificada
<222> (16)..(16)
<223> 5-propinilo-deoxicitidina

<220>
<221> base_modificada
<222> (20)..(20)
<223> 5-propinilo-deoxicitidina

<220>
<221> base_modificada
<222> (21)..(21)
<223> 5-propinilo-deoxiuracilo

<400> 5
acgagtgggt tatatcgaac tggg 24.

REIVINDICACIONES

1. Un procedimiento para la alteración seleccionada de una secuencia de ADN aceptor bicatenario que comprende la combinación de la secuencia de ADN aceptor bicatenario con un oligonucleótido donador, en el que la secuencia de ADN aceptor bicatenario contiene una primera secuencia de ADN y una segunda secuencia de ADN que es el complemento de la primera secuencia de ADN y en el que el oligonucleótido donador comprende un dominio que comprende al menos una discrepancia con respecto a la secuencia de ADN aceptor bicatenario que ha de ser alterada, preferentemente con respecto a la primera secuencia de ADN, y en el que el oligonucleótido comprende al menos una sección que contiene al menos un nucleótido modificado que tiene una mayor afinidad de enlace en comparación con las A, C, T o G presentes de manera natural, y en el que el nucleótido modificado se enlaza con más fuerza a un nucleótido en la posición opuesta de la primera secuencia de ADN en comparación con un nucleótido presente de manera natural complementario al nucleótido en una posición opuesta de la primera secuencia de ADN en presencia de proteínas que sean susceptibles de intercambio de nucleótidos seleccionados, en el que el nucleótido modificado es una purina de propino C7 o una pirimidina de propino C5, en el que en el oligonucleótido al menos el 50% de las pirimidinas y las purinas está sustituido por sus derivados propinilados y no siendo dicho procedimiento para el tratamiento del cuerpo humano o el cuerpo animal mediante cirugía o terapia, y no siendo dicho procedimiento para la alteración seleccionada del ADN en seres humanos.
2. El procedimiento según la reivindicación 1 en el que en el oligonucleótido al menos el 75% de las pirimidinas y las purinas está sustituido por sus derivados propinilados, preferentemente al menos el 90%.
3. El procedimiento según las reivindicaciones 1-2 en el que la purina es adenosina o guanosina y/o la pirimidina es citosina, uracilo o timidina.
4. El procedimiento según las reivindicaciones 1-3 en el que el nucleótido modificado es una pirimidina.
5. El procedimiento según las reivindicaciones 1-3 en el que el nucleótido modificado es una purina.
6. El procedimiento según una cualquiera de las reivindicaciones precedentes en el que el nucleótido en la posición de la discrepancia no está modificado.
7. El procedimiento según una cualquiera de las reivindicaciones precedentes en el que el oligonucleótido tiene una longitud de 10 a 500 nucleótidos.
8. El procedimiento según la reivindicación 1 en el que la alteración está dentro de una célula seleccionada preferentemente del grupo constituido por una célula vegetal, una célula fúngica, una célula de roedor, una célula de primate, una célula humana o una célula de levadura.
9. El procedimiento según la reivindicación 1 en el que las proteínas están derivadas de un extracto celular.
10. El procedimiento según la reivindicación 9 en el que el extracto celular se selecciona del grupo constituido por un extracto de células vegetales, un extracto de células fúngicas, un extracto de células de roedor, un extracto de células de primate, un extracto de células humanas o un extracto de células de levadura.
11. El procedimiento según la reivindicación 1 en el que la alteración es una delección, una sustitución o una inserción de al menos un nucleótido.
12. El procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones precedentes en el que la célula es una célula eucariota, una célula vegetal, una célula de mamífero no humano o una célula humana.
13. El procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones precedentes en el que el ADN diana procede de hongos, bacterias, plantas, mamíferos o seres humanos.
14. El procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones precedentes en el que el ADN bicatenario procede de ADN genómico, ADN lineal, cromosomas artificiales de mamífero, cromosomas artificiales bacterianos, cromosomas artificiales de levadura, cromosomas artificiales vegetales, ADN cromosómico nuclear, ADN cromosómico de orgánulos o ADN episomático.
15. El procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones precedentes para alterar una célula, corregir una mutación mediante la restauración a la forma natural, inducir una mutación, desactivar una enzima mediante alteración de la región codificante, modificar la bioactividad de una enzima alterando la región codificante, modificar una proteína alterando la región codificante.
16. El procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones precedentes en el que el procedimiento se lleva a cabo ex vivo.

17. El uso de un oligonucleótido según se describe en cualquiera de las reivindicaciones 1 - 16 en una alteración seleccionada de una secuencia de ADN aceptor bicatenario, en el que el uso es ex vivo si el organismo es humano o animal.

Fig 1

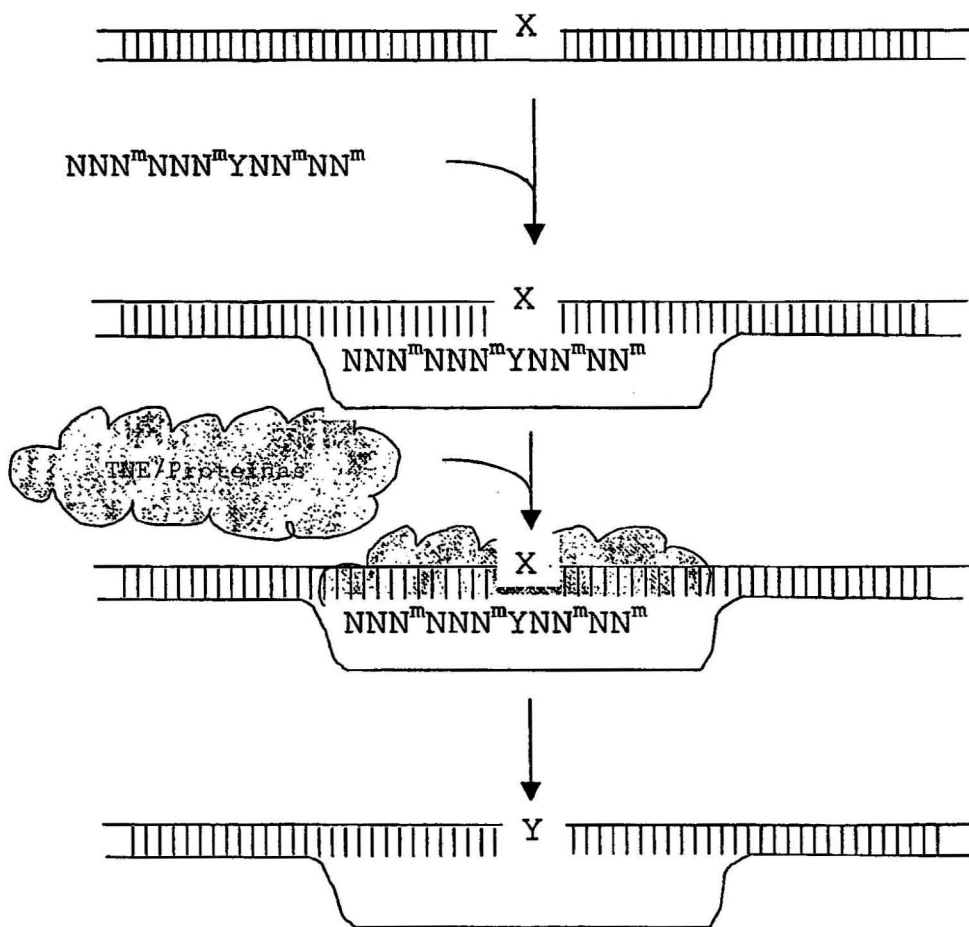


Fig 2

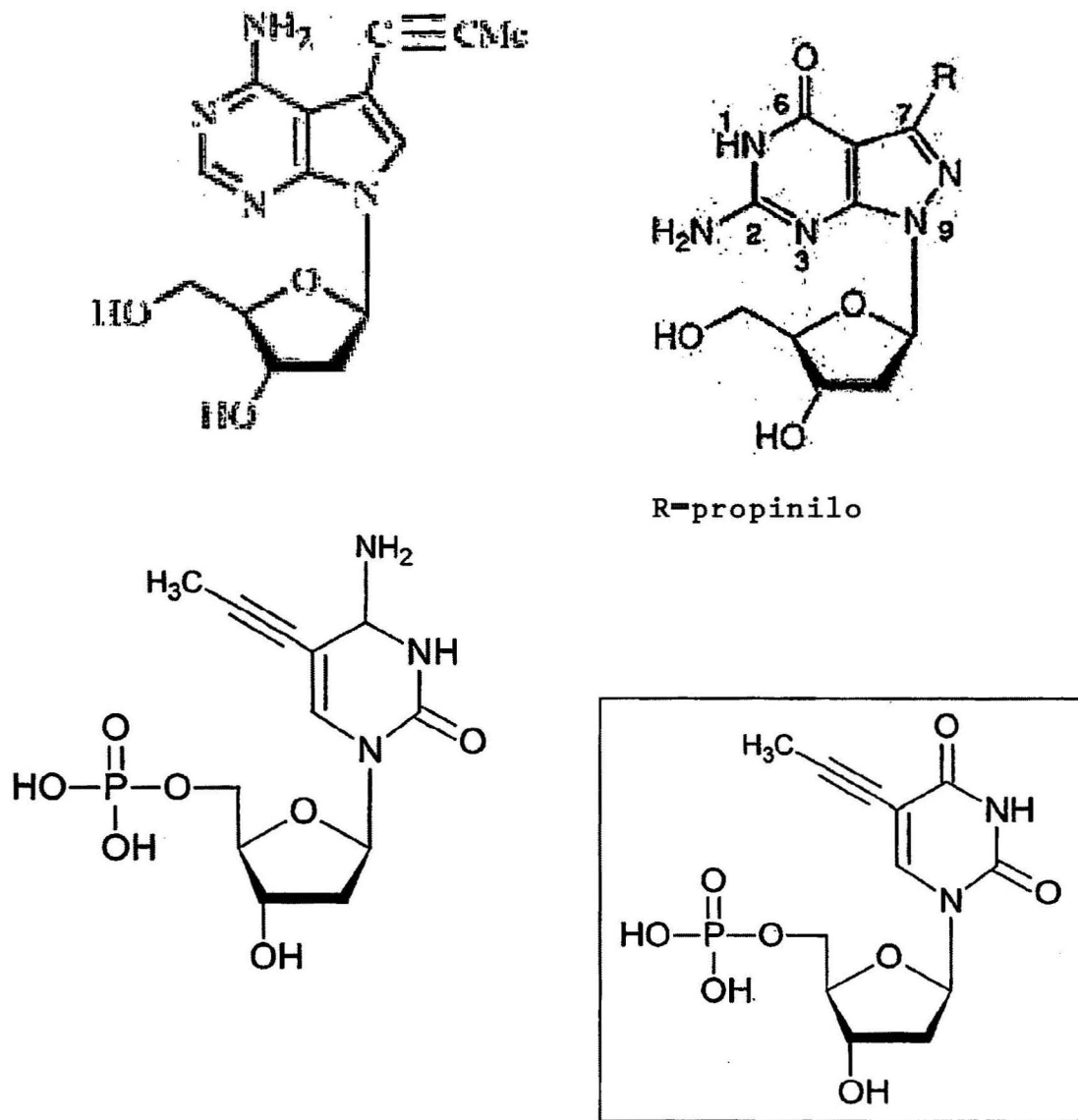


Fig 3

