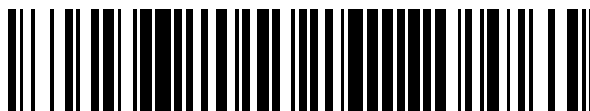


19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 558 007**

51 Int. Cl.:

**C12N 15/09** (2006.01)

**C12M 1/00** (2006.01)

**C12Q 1/68** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **09.09.2011 E 11823664 (5)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **04.11.2015 EP 2615171**

54 Título: **Procedimiento de inhibición de amplificación de ácidos nucleicos usando luz y procedimiento muy sensible de amplificación selectiva de ácidos nucleicos**

30 Prioridad:

**10.09.2010 JP 2010203054**

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

**01.02.2016**

73 Titular/es:

**LSI MEDIENCE CORPORATION (100.0%)  
13-4, Uchikanda 1-chome, Chiyoda-ku  
Tokyo 101-8517, JP**

72 Inventor/es:

**TERASAKI HIROSHI;  
KONNO TSUNETADA;  
SHIMADZU MITSUNOBU;  
FUJIMOTO KENZO y  
SAKAMOTO TAKASHI**

74 Agente/Representante:

**CARPINTERO LÓPEZ, Mario**

ES 2 558 007 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

Procedimiento de inhibición de amplificación de ácidos nucleicos usando luz y procedimiento muy sensible de amplificación selectiva de ácidos nucleicos

**Campo técnico**

- 5 La presente invención se refiere a un procedimiento y a un kit para detectar selectivamente, por ejemplo, un ácido nucleico mutado que coexiste en una pequeña cantidad pequeña junto con ácidos nucleicos de tipo silvestre usando una sonda de fijación que comprende un ácido nucleico fotorreticulante y a un aparato de amplificación de ácidos nucleicos con una unidad de fotoirradiación a una longitud de onda de 350 a 380 nm.

**Técnica anterior**

- 10 Después de completar la secuenciación del genoma humano, se han activado movimientos para usar la información génica obtenida en el campo médico tal como en diagnósticos. Los siguientes objetivos después de la secuenciación del genoma son análisis de perfiles de expresión génica, análisis de sustitución de un único nucleótido (polimorfismo de un único nucleótido, SNP) en genes, y similares. Se han analizado los niveles de expresión de genes expresados en diversas condiciones y mutaciones genéticas, y las funciones de genes y las relaciones de genes con enfermedades o sensibilidad a fármacos se han revelado a partir de los análisis, y la información génica acumulada se usa no solo para el diagnóstico de enfermedades, sino también para la selección del tratamiento.

- 15 En particular, los SNP y las mutaciones son dianas importantes para ensayos genéticos tales como diagnósticos de enfermedades o caracterización de riesgos, y se usan en diversos campos que incluyen diabetes, reumatismo, cáncer, enfermedad mental y cardiopatía. Como procedimiento para detectar los SNP, se han desarrollado diversos procedimientos. Los ejemplos concretos de dichos procedimientos incluyen un procedimiento invasor, un procedimiento de francotirador, un procedimiento de PCR TaqMan, un procedimiento de sonda de hibridación, un procedimiento SNPIT, un procedimiento de pirominisecuenciación, un procedimiento de cromatografía líquida desnaturalizante de alto rendimiento (DHPLC), un procedimiento de MALDI-TOF/EM y un procedimiento de nanochip, como procedimiento para análisis rápidos y de alto rendimiento.

- 20 En el campo del cáncer, se han desarrollado activamente fármacos dirigidos moleculares que se dirigen a una molécula específica en el organismo vivo y suprimen su función. La detección de sustitución de un único nucleótido se recomienda como un ensayo importante en la determinación de la aplicación de fármacos dirigidos moleculares cuando se selecciona el tratamiento. Por ejemplo, se recomienda realizar el ensayo de análisis de mutación para un gen EGFR o un gen KRAS antes de usar los fármacos contra el cáncer. Esto es porque la presencia o la ausencia de mutación causa efectos del fármaco diferentes y se orienta que un fármaco debería administrarse considerando la mutación. Otro objetivo es seleccionar un paciente con un riesgo de efectos adversos graves en lugar de la eficacia del fármaco y con efectos de dosificación bajos examinando la presencia o la ausencia de dicha mutación de antemano. Debido a estas razones, la detección de, en particular, la sustitución de un único nucleótido se recomienda como un ensayo importante en el campo del cáncer.

- 25 No obstante, en la detección de una mutación adquirida tal como cáncer, dado que las moléculas de ácido nucleico de tipo silvestre derivadas de células normales que son dominantes en un espécimen afectan como fondo, una mutación tal como la sustitución de un único nucleótido no puede detectarse mediante técnicas de análisis tal como se han descrito anteriormente en muchos casos. Para resolver este problema se han desarrollado un procedimiento de Scorpion-ARMS y un procedimiento de fijación por PCR de PNA-LNA (Literatura de patente 1).

- 30 El procedimiento de Scorpion-ARMS es un procedimiento de análisis de un producto obtenido amplificando selectivamente una molécula mutada usando una combinación de un cebador diseñado en base a una secuencia mutada de modo que el punto de mutación esté ubicado cerca del extremo terminal 3' del cebador y otro cebador mediante un procedimiento de detección fluorescente, un procedimiento de Scorpion. El procedimiento de fijación por PCR de PNA-LNA es un procedimiento en el que se bloquea selectivamente una molécula de tipo silvestre con un cebador de fijación que está diseñado en el punto de mutación y es complementario con la secuencia de tipo silvestre, y una molécula mutada se amplifica selectivamente y se detecta usando un LNA mutado como sonda de detección fluorescente.

- 35 Estos procedimientos usan una diferencia en la estabilidad térmica en el sistema en equilibrio de un híbrido que se forma a partir de un cebador o una sonda y una molécula de plantilla. La diferencia entre la formación del híbrido cuando el cebador o la sonda son completamente complementarias con la molécula de plantilla y la formación del híbrido incompleta cuando el cebador o la sonda no son complementarias con la molécula de plantilla en uno o varios nucleótidos es meramente una diferencia en la estabilidad térmica. Por lo tanto, las condiciones apropiadas capaces de distinguir la molécula de tipo silvestre de la molécula mutada son diferentes según la secuencia de nucleótidos de interés, y las condiciones que cambian la estabilidad térmica actúan igualmente sobre ambas moléculas incluso en condiciones apropiadas. Es decir, en la medida en que solo la diferencia en la estabilidad térmica de la formación del híbrido en el sistema en equilibrio se use como el principio de la distinción entre ambas, tenemos que seleccionar condiciones de temperatura que incluyan compromisos entre el equilibrio de la especificidad y la sensibilidad, y la

anchura del intervalo de condiciones de temperatura seleccionable es extremadamente estrecha en muchos casos y, por lo tanto, el diseño de la sonda y el cebador es a menudo difícil para algunas secuencias génicas.

En estas circunstancias de técnicas de detección, se proporcionan limitaciones estrictas para la recogida de especímenes en el ensayo actual de detección de mutación para cáncer. Más particularmente, se recomienda que se preparen especímenes patológicos a partir de tejidos cancerosos, el sitio de tumor se identifique a partir de especímenes teñidos y solo se recoja el tumor a partir de especímenes no teñidos de secciones seriadas (The Guidance on the measurement of KRAS gene mutations in colon cancer patients). No obstante, la identificación del sitio del tumor requiere conocimientos especializados de morfología estructural y sus procedimientos son complicados y de alto coste.

- 5  
10 Por lo tanto, es deseable un procedimiento de detección con alta especificidad y alta sensibilidad, en el que existan pocas limitaciones sobre la recogida de especímenes y la secuencia de nucleótidos de un gen diana como requerimientos del ensayo.

15 Como procedimiento de detección con alta especificidad y alta sensibilidad se ha desarrollado un procedimiento de detección de un gen mutado usando un ácido nucleico fotorreticulante. Por ejemplo, la Literatura de patente 2 divulga un procedimiento de detección de un ácido nucleico diana que tiene una secuencia de nucleótidos específica basado en la formación del híbrido con una cadena complementaria, con alta especificidad y alta sensibilidad. En este procedimiento, se usan un ácido nucleico fotorreticulante complementario con el ácido nucleico diana y un ácido nucleico fotorreticulado que tiene un resto básico capaz de fotorreticularse con el ácido nucleico fotorreticulante en el extremo terminal 3' o 5', y uno de los dos ácidos nucleicos tiene una porción de marcador y el otro está inmovilizado en un sustrato. Según este procedimiento, el ácido nucleico fotorreticulante y el ácido nucleico fotorreticulado presentes en la misma cadena se reticulan específicamente entre sí, usando fotorreticulación, solo cuando se forma un híbrido completo, la molécula de ácido nucleico con la porción de marcador puede inmovilizarse covalentemente sobre el sustrato, puede realizarse un lavado completo en condiciones en las que se disocian las cadenas bicatenarias complementarias y lograrse una alta especificidad y una alta sensibilidad.

- 20  
25 No obstante, la sensibilidad de la detección en este procedimiento tiene un límite inferior y, por lo tanto, este procedimiento puede usarse para detectar la presencia o la ausencia de mutación presente en una gran cantidad de ácidos nucleicos diana, pero no puede usarse para detectar una pequeña cantidad de ácido nucleico mutado que coexista con una gran cantidad de ácido nucleico de tipo silvestre, debido a que el contenido del ácido nucleico mutado en una cantidad pequeña es inferior o igual a la sensibilidad de detección en muchos casos. Además, debido a que el ácido nucleico fotorreticulante está unido covalentemente al ácido nucleico fotorreticulado en la misma cadena, la mutación contenida en el ácido nucleico diana que se va a detectar no puede amplificarse.

30 Por otra parte, la Literatura de patente 3 divulga un procedimiento en el que una muestra que contiene un ácido nucleico diana se somete en primer lugar a amplificación por PCR y después se realiza el procedimiento divulgado en la Literatura de patente 2, para detectar un ácido nucleico que tiene una secuencia de nucleótidos diana o dos o más secuencias de nucleótidos diana en la muestra de ácido nucleico. Cuando el contenido del ácido nucleico mutado es pequeño, el porcentaje de contenido del ácido nucleico de tipo silvestre no cambia, incluso si la amplificación por PCR puede realizarse y, por lo tanto, el ácido nucleico no puede amplificarse al nivel detectable mediante la amplificación dentro del intervalo detectable in vitro. Por lo tanto, este procedimiento puede usarse para detectar la presencia o la ausencia de mutación contenida en una gran cantidad de ácido nucleico diana, pero no puede usarse para detectar una pequeña cantidad de ácido nucleico mutado que coexiste con una gran cantidad de ácido nucleico de tipo silvestre. Además, dado que una muestra que contiene el ácido nucleico diana se somete a amplificación por PCR, si el porcentaje de contenido del ácido nucleico mutado es superior a un determinado nivel, existe una posibilidad de detectar el ácido nucleico mutado, pero este procedimiento precisa de varias etapas y es complicado y, por lo tanto, no puede cumplir con la demanda de la escena clínica que requiere resultados de ensayo rápidos.

- 35  
40  
45 Otros documentos de la técnica anterior se refieren a procedimientos de detección de la cantidad de un ácido nucleico en una muestra o el enriquecimiento selectivo de polinucleótidos poco abundantes en una muestra; véase el documento WO 2005/072133, el documento WO 2006/102569 o el documento WO 03/095680. También se divulgan otros procedimientos de detección y/o cuantificación de ácidos nucleicos mutantes raros en poblaciones de ácidos nucleicos en las que los ácidos nucleicos de tipo silvestre están presentes con una abundancia sustancialmente superior a la de los mutantes raros; véase el documento WO 2007/106534. Además, Qiagen "Sample & Assay Technologies Q - Pure Detection", Rotor-Gene Q - Pure Detection, proporciona un aparato para la amplificación y/o cuantificación génica.

#### Lista de referencias

##### Literatura de patente

- 55 [Literatura de patente 1] Patente japonesa Nº 4216266  
[Literatura de patente 2] documento WO2007/058326  
[Literatura de patente 3] Publicación de patente japonesa no examinada (Kokai) Nº 2009-213445

**Sumario de la invención**

Problema técnico

5 Un objeto de la presente invención es proporcionar un procedimiento para detectar rápida y fácilmente un ácido nucleico mutado que está presente en una cantidad pequeña en una muestra de ácidos nucleicos junto con ácidos nucleicos de tipo silvestre, con alta especificada y alta sensibilidad.

Solución al problema

10 Los presentes inventores realizaron estudios intensivos para resolver el objeto y encontraron que una sonda de fijación que comprende un ácido nucleico fotorreticulante y que tiene una secuencia complementaria a un sitio diana que tiene una secuencia de ácido nucleico de tipo silvestre se reticula con un ácido nucleico de tipo silvestre que tiene el sitio diana, para inhibir selectivamente la amplificación del ácido nucleico de tipo silvestre. Es decir, dicho ácido nucleico fotorreticulante se usa para realizar específicamente la fotorreticulación solo cuando se forma un híbrido completo, y para mantener la unión (es decir, un estado de no equilibrio) en cualquier ciclo de temperatura de una reacción de amplificación de ácidos nucleicos y, como resultado, puede inhibirse que la molécula diana funcione como plantilla para la reacción de amplificación de ácidos nucleicos. Dicho hallazgo posibilita tanto el efecto de fijación alto (es decir, la inhibición) de un ácido nucleico de tipo silvestre como la amplificación de ácidos nucleicos selectiva (es decir, específica) de un ácido nucleico mutado.

La invención se refiere a las realizaciones definidas en las reivindicaciones. Por lo tanto, se refieren a los puntos siguientes:

1. Un procedimiento de detección de un ácido nucleico mutado que comprende las etapas de:
  - 20 (a) permitir a
    - una sonda de fijación que comprende un ácido nucleico fotorreticulante y que tiene una secuencia complementaria a un sitio diana que tiene una secuencia de un ácidos nucleicos de tipo silvestre, y
    - a una muestra de ácido nucleico,
    - 25 coexistir entre sí, y formar específicamente un híbrido de la sonda de fijación con una molécula de ácido nucleico de tipo silvestre que tiene el sitio diana;
  - (b) fotorreticular la sonda de fijación/molécula de ácido nucleico diana que forman el híbrido mediante fotoirradiación;
  - (c) someter el producto de reacción obtenido en las etapas (a) y (b) a una reacción de amplificación de ácido nucleico y
  - 30 (d) analizar el producto amplificado resultante,
    - en el que una región de detección que comprende un sitio diana del ácido nucleico mutado se amplifica selectivamente para detectar la presencia o la ausencia del ácido nucleico mutado.
2. Un procedimiento de detección de un ácido nucleico mutado que comprende las etapas de:
  - 35 (a) permitir a
    - una sonda de fijación que comprende un ácido nucleico fotorreticulante y que tiene una secuencia complementaria a un sitio diana que tiene una secuencia de un ácido nucleico de tipo silvestre, y
    - a una muestra de ácido nucleico.
    - coexistir entre sí, y formar específicamente un híbrido de la sonda de fijación con una molécula de ácido nucleico de tipo silvestre que tiene el sitio diana;
    - 40 (b) fotorreticular la sonda de fijación/molécula de ácido nucleico diana que forman el híbrido mediante fotoirradiación;
    - (c) realizar las etapas (a) y (b) durante una reacción de amplificación de ácidos nucleicos y
    - (d) analizar el producto amplificado resultante,
      - 45 en el que una región de detección que comprende un sitio diana del ácido nucleico mutado se amplifica selectivamente para detectar la presencia o la ausencia del ácido nucleico mutado.

3. El procedimiento según uno cualquiera de los puntos 1 o 2, en el que la reacción de amplificación de ácidos nucleicos es un procedimiento de PCR.
4. El procedimiento según uno cualquiera de los puntos 1 o 2, en el que la reacción de amplificación de ácidos nucleicos es un procedimiento de PCR en tiempo real.
5. El procedimiento según uno cualquiera de los puntos 1 o 2, en el que la sonda de fijación tiene una secuencia complementaria a la cadena sentido y/o la cadena antisentido de la molécula de ácido nucleico diana.
6. El procedimiento según uno cualquiera de los puntos 1 a 5, en el que la longitud de cadena de la sonda de fijación es de 7 a 30 nucleótidos.
10. El procedimiento según uno cualquiera de los puntos 1 a 6, en el que la fotoirradiación se realiza a una longitud de onda de 350 a 380 nm.
8. El procedimiento según uno cualquiera de los puntos 1 a 7, en el que la fotoirradiación se realiza una o más veces en un ciclo de temperatura en el que las cadenas complementarias ordinarias se unen y se disocian entre sí, a una temperatura en la que las cadenas complementarias pueden unirse entre sí.
15. El procedimiento según uno cualquiera de los puntos 1 a 8, en el que la fotoirradiación se realiza usando un aparato de amplificación de ácidos nucleicos con una unidad de fotoirradiación a una longitud de onda de 350 a 380 nm.
10. Uso de un kit para detectar un ácido nucleico mutado en un procedimiento según los puntos 1-9, que comprende:
  20. una sonda de fijación que comprende un ácido nucleico fotorreticulante y que tiene una secuencia complementaria a un sitio diana que tiene una secuencia de un ácido nucleico de tipo silvestre y un cebador capaz de amplificar una región de detección que comprende un sitio diana, en el que una región de detección que comprende un sitio diana del ácido nucleico mutado se amplifica selectivamente para detectar la presencia o la ausencia del ácido nucleico mutado.
  25. 11. Uso de un aparato de amplificación de ácidos nucleicos con una unidad de fotoirradiación a una longitud de onda de 350 a 380 nm para detectar un ácido nucleico mutado en un procedimiento según los puntos 1-9.
  12. Uso de un aparato de amplificación de ácidos nucleicos con una unidad de fotoirradiación a una longitud de onda de 350 a 380 nm para detectar un ácido nucleico mutado que comprende las etapas de:
    30. (a) permitir a una sonda de fijación que comprende un ácido nucleico fotorreticulante y que tiene una secuencia complementaria a una sitio diana, y a una muestra de ácido nucleico. coexistir entre sí, y formar específicamente un híbrido de la sonda de fijación con una molécula de ácido nucleico que tiene el sitio diana;
    35. (b) fotorreticular la sonda de fijación/molécula de ácido nucleico diana que forman el híbrido mediante fotoirradiación y
    - (c) someter el producto de reacción obtenido en las etapas (a) y (b) a una reacción de amplificación de ácidos nucleicos.
  40. 13. Uso de un aparato de amplificación de ácidos nucleicos con una unidad de fotoirradiación a una longitud de onda de 350 a 380 nm para detectar un ácido nucleico mutado que comprende las etapas de:
    45. (a) permitir a una sonda de fijación que comprende un ácido nucleico fotorreticulante y que tiene una secuencia complementaria a una sitio diana, y a una muestra de ácido nucleico. coexistir entre sí, y formar específicamente un híbrido de la sonda de fijación con una molécula de ácido nucleico que tiene el sitio diana;

- (b) fotorreticular la sonda de fijación/molécula de ácido nucleico diana que forman el híbrido mediante fotoirradiación y
- (c) realizar las etapas (a) y (b) durante una reacción de amplificación de ácidos nucleicos.

La presente divulgación se refiere a:

- 5 [1] Un procedimiento para inhibir la amplificación de una región de detección que comprende un sitio diana, realizándose dicha amplificación mediante un procedimiento de amplificación de ácidos nucleicos que comprende las etapas de:
- permitir a
  - un ácido nucleico que tiene un sitio diana, y
- 10 a una sonda de fijación que comprende un ácido nucleico fotorreticulante y que tiene una secuencia complementaria a un sitio diana coexistir entre sí y
- fotorreticular el ácido nucleico que tienen el sitio diana con la sonda de fijación mediante fotoirradiación.
- [2] Un procedimiento de detección de un ácido nucleico mutado que comprende las etapas de:
- (a) permitir a
- 15 una sonda de fijación que comprende un ácido nucleico fotorreticulante y que tiene una secuencia complementaria a un sitio diana que tiene una secuencia de un ácido nucleico de tipo silvestre, y
- a una muestra de ácido nucleico.
- coexistir entre sí, y formar específicamente un híbrido de la sonda de fijación con una molécula de ácido nucleico de tipo silvestre que tiene el sitio diana;
- (b) fotorreticular la sonda de fijación/molécula de ácido nucleico diana que forman el híbrido mediante fotoirradiación;
  - (c) someter el producto de reacción obtenido en las etapas (a) y (b) a una reacción de amplificación de ácido nucleico y
  - (d) analizar el producto amplificado resultante,
- 25 en el que una región de detección que comprende un sitio diana del ácido nucleico mutado se amplifica selectivamente para detectar la presencia o la ausencia del ácido nucleico mutado.
- [3] Un procedimiento de detección de un ácido nucleico mutado que comprende las etapas de:
- (a) permitir a
- 30 una sonda de fijación que comprende un ácido nucleico fotorreticulante y que tiene una secuencia complementaria a un sitio diana que tiene una secuencia de un ácido nucleico de tipo silvestre, y
- a una muestra de ácido nucleico.
- coexistir entre sí, y formar específicamente un híbrido de la sonda de fijación con una molécula de ácido nucleico de tipo silvestre que tiene el sitio diana;
- (b) fotorreticular la sonda de fijación/molécula de ácido nucleico diana que forman el híbrido mediante fotoirradiación;
  - (c) realizar las etapas (a) y (b) durante una reacción de amplificación de ácidos nucleicos y
  - (d) analizar el producto amplificado resultante,
- 35 en el que una región de detección que comprende un sitio diana del ácido nucleico mutado se amplifica selectivamente para detectar la presencia o la ausencia del ácido nucleico mutado.
- 40 El procedimiento según uno cualquiera de [1] a [3], en el que la reacción de amplificación de ácidos nucleicos es un procedimiento de PCR.
- [5] El procedimiento según uno cualquiera de [1] a [3], en el que la reacción de amplificación de ácidos nucleicos es un procedimiento de PCR en tiempo real.

- [6] El procedimiento según uno cualquiera de [1] a [3], en el que la sonda de fijación tiene una secuencia complementaria a la cadena sentido y/o la cadena antisentido de la molécula de ácido nucleico diana.
- [7] El procedimiento según uno cualquiera de [1] a [6], en el que la longitud de cadena de la sonda de fijación es de 7 a 30 nucleótidos.
- 5 [8] El procedimiento según una cualquiera de [1] a [7], en el que la fotoirradiación se realiza a una longitud de onda de 350 a 380 nm.
- [9] El procedimiento según uno cualquiera de [1] a [8], en el que la fotoirradiación se realiza una o más veces en un ciclo de temperatura en el que las cadenas complementarias ordinarias se unen y se disocian entre sí, a una temperatura en la que las cadenas complementarias pueden unirse entre sí.
- 10 [10] El procedimiento según uno cualquiera de [1] a [9], en el que la fotoirradiación se realiza usando un aparato de amplificación de ácidos nucleicos con una unidad de fotoirradiación a una longitud de onda de 350 a 380 nm.
- [11] Un kit para inhibir la amplificación de una región de detección que comprende un sitio diana, realizándose dicha amplificación mediante un procedimiento de amplificación génica que comprende:
- 15 una sonda de fijación que comprende un ácido nucleico fotorreticulante y que tiene una secuencia complementaria al sitio diana y
- un cebador capaz de amplificar la región de detección que comprende el sitio diana,
- [12] Un kit para detectar un ácido nucleico mutado que comprende:
- una sonda de fijación que comprende un ácido nucleico fotorreticulante y que tiene una secuencia complementaria a un sitio diana que tiene una secuencia de un ácido nucleico de tipo silvestre y
- 20 un cebador capaz de amplificar una región de detección que comprende un sitio diana,
- en el que una región de detección que comprende un sitio diana del ácido nucleico mutado se amplifica selectivamente para detectar la presencia o la ausencia del ácido nucleico mutado.
- [13] Un aparato de amplificación de ácidos nucleicos con una unidad de fotoirradiación a una longitud de onda de 350 a 380 nm.
- 25 [14] Un aparato de amplificación de ácidos nucleicos con una unidad de fotoirradiación a una longitud de onda de 350 a 380 nm que comprende las etapas de:
- (a) permitir a
- una sonda de fijación que comprende un ácido nucleico fotorreticulante y que tiene una secuencia complementaria a una sitio diana, y
- 30 a una muestra de ácido nucleico.
- coexistir entre sí, y formar específicamente un híbrido de la sonda de fijación con una molécula de ácido nucleico que tiene el sitio diana;
- (b) fotorreticular la sonda de fijación/molécula de ácido nucleico diana que forman el híbrido mediante fotoirradiación y
- 35 (c) someter el producto de reacción obtenido en las etapas (a) y (b) a una reacción de amplificación de ácidos nucleicos.
- [15] Un aparato de amplificación de ácidos nucleicos con una unidad de fotoirradiación a una longitud de onda de 350 a 380 nm que comprende las etapas de:
- (a) permitir a
- 40 una sonda de fijación que comprende un ácido nucleico fotorreticulante y que tiene una secuencia complementaria a una sitio diana y
- una muestra de ácido nucleico.
- coexistir entre sí, y formar específicamente un híbrido de la sonda de fijación con una molécula de ácido nucleico que tiene el sitio diana;

- (b) fotorreticular la sonda de fijación/molécula de ácido nucleico diana que forman el híbrido mediante fotorradiación y
- (c) realizar las etapas (a) y (b) durante una reacción de amplificación de ácidos nucleicos.

Efecto ventajoso de la invención

- 5 Según la presente invención, la presencia o la ausencia de un ácido nucleico mutado que está presente en una cantidad pequeña en una muestra de ácidos nucleicos puede detectarse rápida y fácilmente con alta especificidad y alta sensibilidad.

**Breve descripción de los dibujos**

La Fig. 1 es la formula estructural de 3-cianovinilcarbazol-1'-β-desoxirribósido (CNVK).

- 10 La Fig. 2 es un gráfico que muestra los resultados de confirmación, usando un LightCycler, de la presencia o la ausencia de inhibición de la amplificación por PCR de un gen de tipo silvestre mediante reacción de fotorreticulación en el ejemplo 1.

- 15 La Fig. 3 es un gráfico que muestra los resultados de confirmación, usando un LightCycler, de la presencia o la ausencia de inhibición de la amplificación por PCR de un gen mutado mediante reacción de fotorreticulación en el ejemplo 2.

La Fig. 4 es una fotografía que muestra los resultados de confirmación, mediante electroforesis en gel de agarosa, de la presencia o la ausencia de amplificación selectiva de un gen mutado en el caso de que la reacción de fotorreticulación se haya realizado durante una reacción de amplificación por PCR en el ejemplo 4. El carril 1 es un marcador (φX174 HaeIII digest), el carril 2 es el tipo silvestre y el carril 3 es el tipo mutado.

- 20 La Fig. 5 es un gráfico que muestra los resultados de confirmación, usando un LightCycler, de la detección de un gen mutado en el caso de que la reacción de fotorreticulación no se haya realizado durante una reacción de amplificación por PCR (control) en el ejemplo 5.

- 25 La Fig. 6 es un gráfico que muestra los resultados de confirmación, usando un LightCycler, de la sensibilidad de detección de un gen mutado mediante una reacción PCR de fijación PNA-LNA (*PNA-LNA clamp PCR*) (sin una reacción de fotorreticulación durante la reacción de amplificación por PCR) (ejemplo comparativo) en el ejemplo 5.

La Fig. 7 es un gráfico que muestra los resultados de confirmación, usando un LightCycler, de la detección de un gen mutado en el caso de que la reacción de fotorreticulación se realizara durante una reacción de amplificación por PCR en el ejemplo 5.

30 **Descripción de realizaciones**

Las definiciones de los términos y las expresiones que se usan en el presente documento, tales como ADN, ARN, ácido nucleico, gen, expresión génica, código, complementario, plantilla, promotor, sonda, cebador, hibridación y PCR, son las mismas que se usan habitual y comúnmente en biología molecular, genética, ingeniería genética y similares.

- 35 La expresión "ácido nucleico", tal como se usa en el presente documento no está limitada, siempre que sea ADN o ARN, o análogos de ácidos nucleicos tal como se describen más adelante. El ácido nucleico puede ser un compuesto de origen natural o un compuesto sintético. Los ejemplos de ácidos nucleicos de origen natural incluyen ADN genómico, ARNm, ARNt, ARNr y ARN recogidos de organismos. Los ejemplos de la síntesis de ácidos nucleicos incluyen ADN sintetizado mediante un procedimiento de síntesis química conocido tal como el procedimiento de la β-cianoetilfosforamidita o un procedimiento de síntesis en fase sólida de ADN, ácido nucleico sintetizado mediante un procedimiento de amplificación de ácidos nucleicos tal como PCR y ADNc sintetizado mediante una reacción transcripcional inversa.

- 45 La expresión "ácido nucleico de tipo silvestre", tal como se usa en el presente documento, significa un ácido nucleico antes de la mutación, normalmente, un ácido nucleico que no tiene mutaciones y que contiene información genética que tiene sus funciones normales originales. La expresión "información genética", tal como se usa en el presente documento, incluye no solo una región transcripcional que codifica información de ARNm, ARNt, ARNr, ARNs y similares, sino también una región reguladora tal como un promotor que se requiera para la expresión génica.

- 50 La expresión "ácido nucleico mutado", tal como se usa en el presente documento, significa un ácido nucleico en el que ha tenido lugar una mutación. El término "mutación", tal como se usa en el presente documento, significa un cambio en la secuencia de un ácido nucleico tal como ADN y ARN, e incluye la sustitución, inserción, deleción, inversión, duplicación, translocación de una base y similares usadas en genética y similares. La región de la mutación en un ácido nucleico mutado no está limitada a una región transcripcional, sino que incluye una región reguladora tal



como un promotor que se requiera para la expresión génica. A este respecto, la mutación en un ácido nucleico mutado no requiere un cambio funcional. La "mutación" incluye mutaciones congénitas y adquiridas.

5 La expresión "sitio diana", tal como se usa en el presente documento, significa un sitio que es una diana de una sonda de fijación que comprende un ácido nucleico fotorreticulante en una secuencia de ácidos nucleicos y que tiene una secuencia de nucleótidos que se hibrida con la totalidad o con parte de la sonda de fijación.

10 La expresión "sitio diana", tal como se usa en realizaciones ordinarias, significa un sitio en el que una base mutada existe en un ácido nucleico mutado, y un sitio que se va a detectar con una diana en la presente invención, que incluye un ácido nucleico de tipo silvestre. Por ejemplo, en el caso de la sustitución de una base, el sitio diana es la base que está sustituida tanto en un ácido nucleico de tipo silvestre como en un ácido nucleico mutado. En el caso de una inserción, el sitio diana en un ácido nucleico mutado es una base insertada y el sitio diana en un ácido nucleico de tipo silvestre es un sitio en el que la base se inserta en el ácido nucleico mutado. En el caso de una delección, el sitio diana en un ácido nucleico mutado es un sitio en el que se ha eliminado una base por delección y el sitio diana en un ácido nucleico de tipo silvestre es la base eliminada en el ácido nucleico mutado. La secuencia de un sitio diana puede ser una cadena que tiene una secuencia que codifica información genética (en adelante denominada una cadena sentido) o una cadena que tiene una secuencia complementaria con la cadena sentido (en adelante denominada una cadena antisentido).

15 La expresión "reacción de amplificación de ácidos nucleicos", tal como se usa en el presente documento, significa una reacción de amplificación de una plantilla de ácidos nucleicos usando una reacción de la polimerasa conocida. La expresión "aparato de amplificación de ácidos nucleicos", tal como se usa en el presente documento, significa un aparato mediante el que puede realizarse la "reacción de amplificación de ácidos nucleicos".

20 El procedimiento para inhibir la amplificación de la presente invención es un procedimiento en el que, aunque se realice un procedimiento de amplificación de ácidos nucleicos ordinario usando cebadores capaces de amplificar una región de detección que comprende un sitio diana, se inhibe la amplificación de un ácido nucleico (por ejemplo, un ácido nucleico de tipo silvestre), mientras que el otro ácido nucleico (por ejemplo, un ácido nucleico mutado) se amplifica selectivamente, en base a la mutación en el sitio diana.

25 En la presente invención, el objeto de la inhibición de la amplificación no está limitado, y pueden seleccionarse apropiadamente o bien un ácido nucleico de tipo silvestre o bien un ácido nucleico mutado como el objeto según este fin. Por ejemplo, en el caso en el que existe una diferencia significativa en los contenidos en una muestra de ácidos nucleicos, la presencia o la ausencia de un ácido nucleico que existe en una pequeña cantidad (por ejemplo, un ácido nucleico mutado) puede detectarse inhibiendo la amplificación de un ácido nucleico que existe en una gran cantidad (por ejemplo, un ácido nucleico de tipo silvestre) y amplificando selectivamente el ácido nucleico que existe en una pequeña cantidad.

30 A continuación se explicará fundamentalmente el procedimiento de la presente invención en base a una realización de la presente invención, un procedimiento para detectar un ácido nucleico mutado para detectar la presencia o la ausencia del ácido nucleico mutado. No obstante, una característica esencial del procedimiento de la presente invención es, tal como se describe en el presente documento, la inhibición de la amplificación de solo un ácido nucleico en base a la mutación en el sitio diana aunque se realice un procedimiento de amplificación de ácidos nucleicos ordinario usando cebadores capaces de amplificar una región de detección que comprende el sitio diana.

35 La primera realización del procedimiento de la presente invención es un procedimiento de detección de un ácido nucleico mutado que comprende las etapas de:

(a) permitir a

una sonda de fijación que comprende un ácido nucleico fotorreticulante y que tiene una secuencia complementaria a un sitio diana que tiene una secuencia de un ácido nucleico de tipo silvestre, y

a una muestra de ácido nucleico

45 coexistir entre sí, y formar específicamente un híbrido de la sonda de fijación con una molécula de ácido nucleico de tipo silvestre que tiene el sitio diana;

(b) fotorreticular la sonda de fijación/molécula de ácido nucleico diana que forman el híbrido mediante fotoirradiación;

50 (c) someter el producto de reacción obtenido en las etapas (a) y (b) a una reacción de amplificación de ácido nucleico y

(d) analizar el producto amplificado resultante,

en el que una región de detección que comprende un sitio diana del ácido nucleico mutado se amplifica selectivamente para detectar la presencia o la ausencia del ácido nucleico mutado.

La segunda realización del procedimiento de la presente invención es un procedimiento de detección de un ácido nucleico mutado que comprende las etapas de:

(a) permitir a

5 una sonda de fijación que comprende un ácido nucleico fotorreticulante y que tiene una secuencia complementaria a un sitio diana que tiene una secuencia de un ácido nucleico de tipo silvestre, y a una muestra de ácido nucleico

coexistir entre sí, y formar específicamente un híbrido de la sonda de fijación con una molécula de ácido nucleico de tipo silvestre que tiene el sitio diana;

10 (b) fotorreticular la sonda de fijación/molécula de ácido nucleico diana que forman el híbrido mediante fotirradiación;

(c) realizar las etapas (a) y (b) durante una reacción de amplificación de ácidos nucleicos y

(d) analizar el producto amplificado resultante,

en el que una región de detección que comprende un sitio diana del ácido nucleico mutado se amplifica selectivamente para detectar la presencia o la ausencia del ácido nucleico mutado.

15 En la presente invención, un ácido nucleico mutado puede detectarse con alta sensibilidad mediante esas etapas, es decir, inhibiendo la amplificación de un ácido nucleico de tipo silvestre y amplificando selectivamente el ácido nucleico mutado.

A continuación se explicará cada etapa individualmente. Dado que la primera realización es la misma que la segunda realización excepto por la etapa (c), cada etapa se explicará principalmente en base a la primera realización y, después, la segunda realización se explicará con respecto a las características diferentes de las de la primera realización.

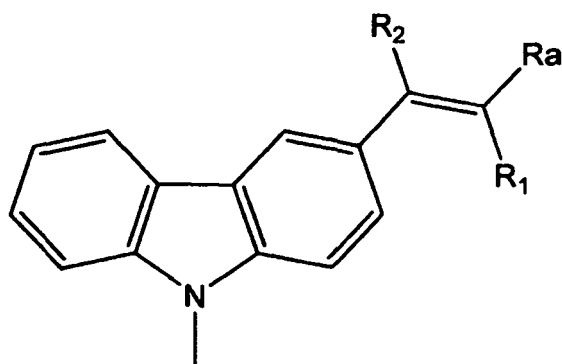
20 En la etapa (a), una sonda de fijación que comprende un ácido nucleico fotorreticulante y que tiene una secuencia complementaria a un sitio diana que tiene una secuencia de un ácido nucleico de tipo silvestre se permite coexistir con una muestra de ácido nucleico, y se forma específicamente un híbrido de la sonda de fijación con una molécula de ácido nucleico diana que tiene la secuencia de ácidos nucleicos de tipo silvestre. Esta reacción puede realizarse en condiciones convencionales adecuadas para la formación de híbridos (temperatura, pH, concentración salina, tampón y similares) y la formación específica del híbrido de la sonda de fijación con el ácido nucleico de tipo silvestre puede promoverse añadiendo, por ejemplo, dimetilsulfóxido (DMSO) o formamida a la solución de reacción. Con respecto a esto, es preferible evitar la incorporación de una sustancia que inhiba una reacción de amplificación de ácidos nucleicos que se realice después o simultáneamente a la formación del híbrido. En particular, una formulación de reacción adecuada para una reacción de amplificación de ácidos nucleicos es preferible cuando la formación del híbrido se realiza al mismo tiempo que la reacción de amplificación de ácidos nucleicos.

25 La "muestra de ácidos nucleicos" usada en la etapa (a) no está limitada, siempre que sea una muestra que contenga ácidos nucleicos y se sospeche que contenga un ácido nucleico que comprenda un sitio diana. Es preferentemente una muestra sospechosa de contener al menos un ácido nucleico de tipo silvestre que tenga un sitio diana y su ácido nucleico mutado, y más preferentemente una muestra sospechosa de contener ambos ácidos nucleicos. Los ejemplos de la muestra de ácidos nucleicos incluyen ARN o ADN genómico obtenidos de células completas contenidas en una muestra tal como sangre o tejidos. El ácido nucleico puede extraerse de una muestra mediante un procedimiento convencional tal como un procedimiento de fenol/cloroformo. Con respecto a esto, el porcentaje de presencia del ácido nucleico mutado en los ácidos nucleicos diana que se van a detectar no está limitado. Por ejemplo, puede ser el 30 100 % de un ácido nucleico de tipo silvestre, o el 50 % de un ácido nucleico de tipo silvestre y el 50 % de un ácido nucleico mutado. La muestra de ácidos nucleicos puede ser ADN obtenido de células, ARNm preparados a partir de células o ADNc obtenidos mediante una reacción de transcripción inversa usando ARNm como plantilla. Además, la muestra de ácidos nucleicos puede ser una mezcla artificial de un número de genes clonados, ácido nucleico amplificado artificialmente por un procedimiento de amplificación de ácidos nucleicos o una mezcla de los mismos.

35 El ácido nucleico fotorreticulante que puede usarse en la presente invención no está limitado, siempre que puede reticularse con ácidos nucleicos en un sitio diana o ácidos nucleicos cerca del sitio diana por fotorreticulación. Por ejemplo, pueden usarse derivados de psoraleno (Chang, E. y col. Biochemistry 1991, 30, 8283), derivados de aminopurina (documento JP 2001-206896 A), o 4-tiouracilo. Dado que los derivados de psoraleno tienen propiedades de que reaccionan específicamente con timina en la secuencia de nucleótidos 5'-AT-3', y los derivados de aminopurina no dependen de la secuencia, pero son específicos de citidina, la aplicación de estos derivados es limitada y, por lo tanto, los ácidos nucleicos fotorreticulantes siguientes sin dichas limitaciones son preferentes.

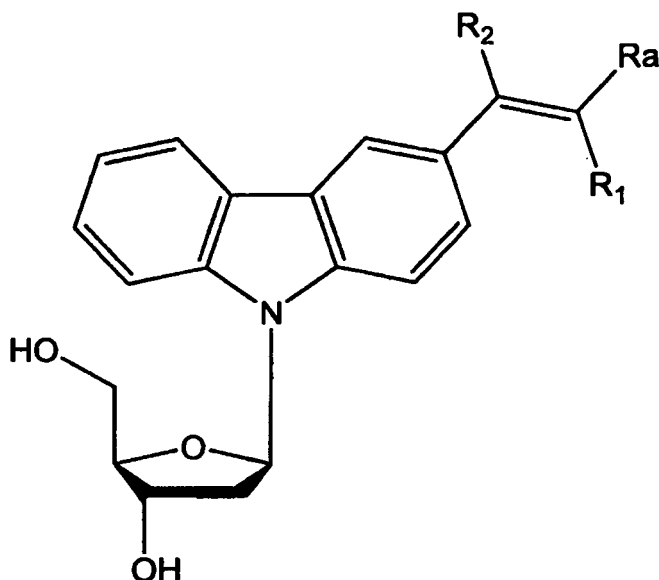
40 Los primeros ácidos nucleicos fotorreticulantes preferentes son ácidos nucleicos que tienen, como resto básico, el grupo de la fórmula I:

[Prod. quim. 1]



- 5 en la que Ra es un grupo ciano, un grupo amida, un grupo carboxilo, un grupo alcoxi C<sub>2</sub>-C<sub>7</sub>-carbonilo o un átomo de hidrógeno y R<sub>1</sub> y R<sub>2</sub> son independientemente grupo ciano, un grupo amida, un grupo carboxilo, un grupo alcoxi C<sub>2</sub>-C<sub>7</sub>-carbonilo o un átomo de hidrógeno (Org. Lett., Vol. 10, N° 15, 2008, documento JP 2009-254279 A). En el caso de que un ácido nucleico unido al mismo sea ADN, el grupo carbazolilo de la fórmula I está unido al átomo de carbono (C) en la posición 1 de 2-desoxirribosa en la posición β, tal como se muestra en la fórmula I(a):

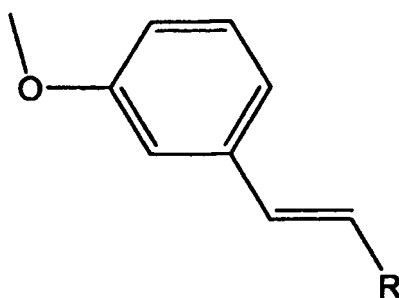
[Prod. quim. 2]



- 10 Los ejemplos concretos de los primeros ácidos nucleicos fotorreticulantes incluyen 3-cianovinilcarbazol-1'-β-desoxirribósido (<sup>CNV</sup>K).

Los segundos ácidos nucleicos fotorreticulantes preferentes son ácidos nucleicos que tienen el grupo de la fórmula II:

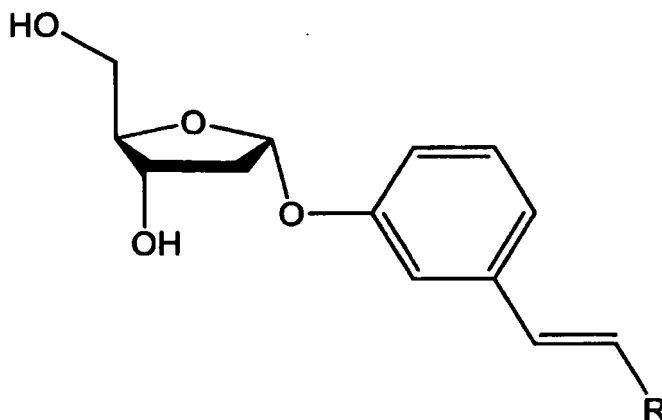
[Prod. quim. 3]



- 15 en la que R es -CN, -CONR<sup>1</sup>R<sup>2</sup> o -COOR<sup>3</sup>, R<sup>1</sup> a R<sup>3</sup> son independientemente un átomo de hidrógeno o un grupo alquilo C<sub>n</sub>H<sub>2n+1</sub> (n≥1), y el límite superior de n no está limitado, pero puede ser, por ejemplo, de 1 a 7, preferentemente de 1 a 5

(Organic & Biomolecular Chemistry 2007, 5, 2583, Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters 15 (2005) 1299-1301, y documento JP 2005-348645 A). En el caso de que un ácido nucleico unido al mismo sea ADN, el grupo fenoxi de la fórmula II está unido al átomo de carbono (C) en la posición 1 de 2-desoxirribosa en la posición  $\beta$ , tal como se muestra en la fórmula II(a):

5 [Prod. quim. 4]



R es preferentemente -CN, -COOH o -COOMe, y más preferentemente -COOH o -COOMe.

Los grupos de la fórmula I y la fórmula II imparten propiedades fotorreticulantes al ácido nucleico. Las propiedades fotorreticulantes pueden impartirse a ADN y ARN, así como a análogos de nucleótidos. Estos ácidos nucleicos fotorreticulantes pueden prepararse de un modo similar a un procedimiento convencional de producción de ácidos nucleicos.

La "sonda de fijación" usada en la etapa (a) significa una sonda de ácidos nucleicos que comprende el ácido nucleico fotorreticulante mencionado anteriormente y que tiene una secuencia complementaria al sitio diana. La sonda de fijación puede comprender el ácido nucleico fotorreticulante que tiene el grupo de la fórmula I o la fórmula II, y la sonda de fijación que comprende el grupo de la fórmula I es preferente. La sonda de fijación puede ser ADN y ARN, así como análogos de nucleótidos. El procedimiento para detectar un ácido nucleico mutado de la presente invención está caracterizado porque el ácido nucleico fotorreticulante contenido en la sonda de fijación tiene la secuencia complementaria al sitio diana del ácido nucleico de tipo silvestre. La secuencia de nucleótidos de la sonda de fijación y la posición y el número de los ácidos nucleicos fotorreticulantes no están limitados, siempre que la sonda de fijación puede hibridarse específicamente con parte o la totalidad del sitio diana. La longitud de la sonda de fijación no está limitada, siempre que puede hibridarse específicamente con la misma, y es preferentemente, por ejemplo, de 7 o 30 nucleótidos.

El "análogo de nucleótido" significa un nucleótido no natural (es decir, producido artificialmente) que tiene las mismas funciones que los nucleótidos de origen natural tal como desoxirribonucleótido (ADN) y ribonucleótido (ARN). Es decir, los análogos de nucleótidos pueden formar una cadena mediante enlace fosfodiéster, como nucleótidos, y un cebador o una sonda preparadas usando análogos de nucleótidos pueden usarse en PCR o hibridación, como un cebador o una sonda preparadas usando solo nucleótidos. Los ejemplos de dichos análogos de nucleótidos incluyen PNA (derivado de nucleótido poliamídico), LNA (BNA) y ENA (ácidos nucleicos puenteados con 2'-O,4'-C-etileno), así como mezclas de los mismos. El PNA es un compuesto en el que la cadena principal que consiste en fosfato y pentosa en ADN o ARN está sustituida por una cadena de poliamida. El LNA (BNA) es un compuesto que tiene dos estructuras cíclicas en el que el átomo de oxígeno de la posición 2' del ribonucleósido está unido al átomo de carbono de la posición 4' del mismo mediante metileno.

La sonda de fijación usada en la etapa (a) pueden prepararse no solo contra la cadena sentido, sino también contra la cadena antisentido. En particular, en el caso en el que un ácido nucleico presente en una muestra de ácidos nucleicos sea ADN bicatenario, el efecto de inhibición de la amplificación de ácidos nucleicos del ácido nucleico de tipo silvestre puede aumentarse en la etapa (c) que se describe más adelante, usando simultáneamente ambas sondas de fijación preparadas contra ambas cadenas y fotorreticulando las sondas de fijación con los sitios diana de ambas cadenas. Con respecto a las sondas de fijación contra las cadenas sentido y antisentido, es preferente introducir los ácidos nucleicos fotorreticulantes en sitios en los que las sondas de fijación no están fotorreticuladas entre sí.

En la etapa (b), la sonda de fijación y su molécula de ácido nucleico de tipo silvestre complementaria, que forman un híbrido, se someten a fotoirradiación para fotorreticular la sonda de fijación con la molécula de ácido nucleico diana. La fotorreticulación resultante se genera formando un enlace covalente intermolecular entre el ácido nucleico fotorreticulante y la molécula de ácido nucleico diana, debido a la fotorreacción del resto básico artificial del ácido nucleico fotorreticulante y corresponde a reticulación intermolecular. Dado que las moléculas fotorreticuladas no se

ensamblan solo mediante estabilidad térmica, la unión se mantiene sin disociación incluso cuando las moléculas reticuladas están bajo las condiciones en las que se disocian entre sí cadenas bicatenarias complementarias.

5 La reacción de fotorreticulación de la etapa (b) puede llevarse a cabo en una solución de reacción que contiene una sal con actividad tamponadora. Los ejemplos de la sal con actividad tamponadora incluyen sal de cacodilato, sal de fosfato y sal tris. La concentración de la sal con actividad tamponadora es preferentemente de 5 a 250 mmol/l. Además, es preferente que la solución de reacción contenga una sal de metal alcalino y/o sal de metal alcalinotérreo. Los ejemplos del metal alcalino y/o metal alcalinotérreo incluyen cloruro de sodio y cloruro de magnesio. Además, la reacción de fotorreticulación específica entre la sonda de fijación y el ácido nucleico de tipo silvestre puede promoverse añadiendo un disolvente orgánico, tal como DMSO o formamida, a la solución de reacción. En asociación a esto, es preferible evitar la incorporación de una sustancia que inhiba una reacción de amplificación de ácidos nucleicos que se realice después o simultáneamente a la fotorreticulación. En particular, una formulación de reacción adecuada para una reacción de amplificación de ácidos nucleicos es preferente cuando la reticulación se realiza al mismo tiempo que la reacción de amplificación de ácidos nucleicos.

15 En la fotoirradiación de la etapa (b), la longitud de onda de la luz es generalmente de 350 a 380 nm, y preferentemente de 366 nm. La luz láser de una única longitud de onda a 366 nm es la más preferente. En una realización preferente, la reacción de la luz mediante fotoirradiación se realiza preferentemente en un periodo de uno o varios segundos. Con respecto a esto, tomando en consideración la transparencia óptica de un recipiente de reacción y una solución de reacción, el tiempo de reacción de la luz puede prolongarse.

20 Dado que la fotorreticulación de la etapa (b) puede mantener la unión incluso en las condiciones en las que se disocian entre sí cadenas bicatenarias complementarias preparadas mediante formación de híbridos convencional, tal como se ha descrito anteriormente, la reticulación de una molécula de ácido nucleico de tipo silvestre complementaria a la sonda de fijación puede acumularse repitiendo la fotoirradiación en un ciclo de temperatura en el que las cadenas complementarias ordinarias se unen y se disocian entre sí a una temperatura en la que las cadenas complementarias pueden unirse entre sí.

25 En el caso en el que la muestra de ácidos nucleicos usada en las etapas (a) y (b) sea ARN tal como ARNm, después de realizar una reacción de fotorreticulación con la sonda de fijación, puede sintetizarse ADNc y someterse a una reacción de amplificación tal como PCR, o puede realizarse una amplificación génica mediante una PCR de 1 etapa o similar. Como alternativa, después de sintetizar ADNc, puede amplificarse ARN mediante un procedimiento de transcripción in vitro.

30 En el caso en el que la muestra de ácidos nucleicos usada en las etapas (a) y (b) sea ADN monocatenario tal como ADNc, después de realizar una reacción de fotorreticulación con la sonda de fijación, el producto de reacción puede someterse a una reacción de amplificación tal como PCR, o puede amplificarse ARN mediante un procedimiento de transcripción in vitro.

35 En el caso en el que la muestra de ácidos nucleicos usada en las etapas (a) y (b) sea ADN bicatenario tal como ADN cromosómico después de tratar en condiciones desnaturizantes ADN bicatenario hibridado, tal como desnaturización con calor o condiciones ácidas, para convertirlo en un ADN monocatenario, la etapa (a) puede realizarse de un modo similar al caso del ADN monocatenario.

40 En la etapa (c), la muestra de ácidos nucleicos que se ha sometido a la reacción de fotorreticulación se usa como plantilla y se realiza un procedimiento de amplificación de ácidos nucleicos (por ejemplo PCR) usando cebadores de amplificación para amplificar una región de detección que comprende el sitio diana. El cebador de amplificación usado en la etapa (c) es un cebador que es capaz de amplificar una región de detección que comprende el sitio diana de un ácido nucleico mutado y que es también capaz de amplificar una región de detección que comprende el sitio diana de un ácido nucleico de tipo silvestre con el que la sonda de fijación no está fotorreticulada. Dado que la molécula que tiene la secuencia de tipo silvestre está reticulada con la sonda de fijación mediante fotoirradiación, no procede una reacción de alargamiento a partir del nucleótido reticulado al extremo terminal 3' y la molécula que tiene la secuencia de tipo silvestre no se amplifica. Por el contrario, dado que casi todas las moléculas que tienen la secuencia mutada no están reticuladas con la sonda de fijación, tiene lugar una reacción de alargamiento, y como resultado, se logra la amplificación selectiva de ácidos nucleicos.

50 En el caso en el que el procedimiento de amplificación de ácidos nucleicos sea PCR, los cebadores de amplificación usados en la etapa (c) son cebadores capaces de amplificar una secuencia de nucleótidos (secuencia de nucleótidos para amplificación) que comprende una secuencia de nucleótidos diana o dos o más secuencias de nucleótidos diana y dos clases de cebadores entre los que se encuentra emparejada la secuencia de nucleótidos para amplificación. Por ejemplo, los cebadores pueden ser dos clases de cebadores que consisten en un cebador directo que tiene una secuencia de nucleótidos homóloga a la región cadena arriba de la secuencia de nucleótidos para amplificación y un cebador inverso que tiene una secuencia de nucleótidos complementaria a la región cadena debajo de la secuencia de nucleótidos para amplificación. Las concentraciones de los dos cebadores usados en PCR no están limitadas, siempre que la relación de concentración sea un valor capaz de obtener ácidos nucleicos bicatenarios como producto de PCR. Es preferente que se usen los dos cebadores en concentraciones iguales.

Los cebadores usados en PCR pueden diseñarse y sintetizarse según procedimientos convencionales, en base a la información de secuencia de una secuencia de nucleótidos que comprende la secuencia de nucleótidos diana.

5 Los cebadores usados en PCR son compuestos en los que una o más moléculas seleccionadas del grupo que consiste en nucleótidos y análogos de nucleótidos están unidas mediante un enlace fosfodiéster. La longitud del cebador puede seleccionarse aproximadamente según el valor de  $T_m$  del cebador, el tipo de la secuencia de nucleótidos que se va a amplificar y similares y el cebador en el que están unidas de 10 a 100 moléculas es preferente.

10 La PCR puede realizarse mediante un procedimiento convencional, según un protocolo usado comúnmente, usando cantidades usadas comúnmente de reactivos usados comúnmente. La ADN polimerasa usada en PCR no está limitada, siempre que se use comúnmente en PCR, y es preferente una polimerasa termostable.

15 Dado que la reticulación con una molécula diana mediante fotoirradiación inhibe la reacción de alargamiento por polimerasa, no se requiere la resistividad de la sonda de fijación de por sí contra la actividad de nucleasa. Por lo tanto, puede usarse una polimerasa que tenga actividad de nucleasa. En el caso en el que el ácido nucleico que actúa como cebador y causa la reacción de alargamiento por polimerasa se use para sonda de fijación, es preferente que el valor de  $T_m$  se seleccione de modo que el ácido nucleico se disocie de la molécula diana a una temperatura en la que tenga lugar la reacción de alargamiento por polimerasa, o que el extremo terminal 3' de la sonda de fijación se modifique con una sustancia que inhiba la reacción de alargamiento de modo que el ácido nucleico no actúe como cebador de amplificación.

20 En la etapa (d), los ejemplos de un procedimiento para analizar el producto amplificado obtenido mediante la etapa (c) incluyen los procedimientos conocidos siguientes. Por ejemplo, como procedimiento que usa el producto amplificado obtenido mediante la etapa (c), en el caso en el que el ácido nucleico mutado contenido en el producto amplificado tenga una mutación conocida, la presencia o la ausencia del ácido nucleico mutado puede determinarse usando un ensayo de sustrato tal como una micromatriz. Además, cuando se usa un procedimiento RFLP, existe un caso en el que la presente o la ausencia del ácido nucleico mutado puede evaluarse mediante la presencia o la ausencia de digestión con una enzima de restricción. Además, cuando se considera que el sitio diana contiene un ácido nucleico mutado desconocido, la presencia o la ausencia del ácido nucleico mutado puede evaluarse determinando la secuencia de nucleótidos del producto amplificado de la región de detección.

25 Por otra parte, por ejemplo, en el caso en el que el ácido nucleico mutado que se va a evaluar sea una mutación conocida, la presencia o la ausencia del ácido nucleico mutado puede evaluarse o cuantificarse realizando una PCR en tiempo real conocida en la etapa (c). Esta realización en la que se realizan la etapa (c) y la etapa (d) al mismo tiempo es preferente, debido a que la presencia o la ausencia del ácido nucleico mutado puede evaluarse rápida y fácilmente. El procedimiento en el que se realizan la amplificación del ácido nucleico mutado y la evaluación al mismo tiempo mediante una PCR en tiempo real puede realizarse con referencia a la Literatura de patente 1.

30 A continuación, la segunda realización se explicará en base a las características diferentes de las de la primera realización.

35 A diferencia de la primera realización, la etapa (a) y la etapa (b) se realizan durante la reacción de amplificación de ácidos nucleicos de la etapa (c). Más particularmente, por ejemplo, en la PCR, se realiza la fotoirradiación en condiciones de temperatura capaces de formar el híbrido de la molécula diana con la sonda de fijación (es decir, la etapa (a)), y el ácido nucleico diana se une al ácido nucleico fotorreticulante contenido en la sonda de fijación (es decir, la etapa (b)), para amplificar directa y selectivamente el ácido nucleico mutado.

40 La fotoirradiación puede realizarse una o más veces. Dado que la amplificación del ácido nucleico de tipo silvestre puede inhibirse más completamente repitiendo la fotoirradiación en cada ciclo de amplificación, es preferente repetir la fotoirradiación en cada ciclo de PCR. La fotoirradiación puede realizarse en todos los ciclos de amplificación, o la fotoirradiación puede iniciarse o finalizarse en cualquier ciclo de amplificación.

45 La reacción PCR de la etapa (c) puede realizarse usando una formulación de reacción adecuada para una reacción de amplificación por PCR convencional. Además, puede añadirse una sustancia que afecta a las condiciones de hibridación, tal como DMSO o formamida, a la solución de reacción para promover la reacción de amplificación selectiva del ácido nucleico mutado.

El kit de la presente divulgación es un kit para detectar un ácido nucleico mutado que comprende:

50 una sonda de fijación que comprende un ácido nucleico fotorreticulante y que tiene una secuencia complementaria a un sitio diana que tiene una secuencia de un ácido nucleico de tipo silvestre, y

un cebador capaz de amplificar una región de detección que comprende un sitio diana,

en el que una región de detección que comprende un sitio diana del ácido nucleico mutado se amplifica selectivamente para detectar la presencia o la ausencia del ácido nucleico mutado. El kit puede contener también, por ejemplo, un tampón, polimerasa para amplificación y similares.

5 El aparato de la presente invención es un aparato de amplificación de ácidos nucleicos con una unidad de fotoirradiación a una longitud de onda de 350 a 380 nm. El aparato de amplificación de ácidos nucleicos no está limitado, siempre que pueda realizar cada reacción de la presente invención e incluya una unidad de amplificación de ácidos nucleicos conocida. Puede usarse preferentemente un aparato de PCR en tiempo real capaz de cuantificar ácido nucleico amplificado. Puede añadirse a dicho aparato una unidad de fotoirradiación a una longitud de onda de 350 a 380 nm.

El aparato de la presente invención puede comprender preferentemente

un programa que puede realizar las etapas (a) a (c) siguientes de la primera realización de la presente invención:

10 (a) permitir a una sonda de fijación que comprende un ácido nucleico fotorreticulante y que tiene una secuencia complementaria con un sitio diana y una muestra de ácido nucleico coexistir entre sí, y formar específicamente un híbrido de la sonda de fijación con una molécula de ácido nucleico que tiene el sitio diana;

(b) fotorreticular la sonda de fijación/molécula de ácido nucleico diana que forman el híbrido mediante fotoirradiación, y

15 (c) someter el producto de reacción obtenido en las etapas (a) y (b) a una reacción de amplificación de ácidos nucleicos y/o

un programa que puede realizar las etapas (a) a (c) siguientes de la segunda realización de la presente invención:

(a) permitir a una sonda de fijación que comprende un ácido nucleico fotorreticulante y que tiene una complementariedad de secuencia con un sitio diana y una muestra de ácido nucleico coexistir entre sí, y formar específicamente un híbrido de la sonda de fijación con una molécula de ácido nucleico que tiene el sitio diana;

20 (b) fotorreticular la sonda de fijación/molécula de ácido nucleico diana que forman el híbrido mediante fotoirradiación, y

(c) realizar las etapas (a) y (b) durante una reacción de amplificación de ácidos nucleicos.

### Ejemplos

25 La presente invención se ilustrará adicionalmente ahora mediante los ejemplos siguientes, pero no está limitada de ningún modo a los mismos.

#### «Ejemplo 1»

#### Evaluación de la inhibición de la amplificación por PCR con respecto al gen de tipo silvestre

##### (Material y procedimientos)

##### 1. Preparación de sondas de fijación fotorreticulantes

30 Los puntos de mutación Gly12 y Gly13 de un gen KRAS se seleccionaron como el sitio diana, y se diseñó una sonda de fijación complementaria a la cadena sentido capaz de hibridarse con el sitio diana que tenía la secuencia de tipo silvestre. De forma similar, se diseñó una sonda de fijación contra la cadena antisentido. Se introdujo un ácido nucleico fotorreticulante, 3-cianovinilcarbazol-1'-β-desoxirribósido (CNVK) (preparado mediante un procedimiento descrito en el documento JP 2009-254279 A., obtenido de Fujimoto lab., School of Materials Science, Japan Advanced Institute of Science and Technology), en las sondas de fijación en los sitios en los que las sondas de fijación no se habían fotorreticulado entre sí. La síntesis de las sondas de fijación se encomendó a FASMAC Co., Ltd. Las secuencias de las sondas de fijación se muestran en la tabla 1. La fórmula estructural de CNVK se muestra en la figura 1.

Tabla 1

Sonda de fijación	Secuencia	Comentarios
ODN09	GCCTA <sup>CNV</sup> KGCCACCAGC	Complementaria a la cadena sentido de la secuencia de KRAS de tipo silvestre
ODN10	TTGGA <sup>CNV</sup> KCTGGTGGCG	Complementaria a la cadena antisentido de la secuencia de KRAS de tipo silvestre

##### 2. Preparación del fragmento génico de KRAS de tipo silvestre

40 Se preparó ADN genómico humano a partir de sangre periférica de una persona sana mediante un procedimiento convencional. El ADN resultante se usó como plantilla para amplificar una región del exón 2 de KRAS que

comprende los puntos de mutación Gly12 y Gly13, usando cebadores F1 y R1, en condiciones de reacción PCR convencionales. Las secuencias de cebadores usados en la reacción de PCR son las siguientes:

F1: 5'-AAAGGTACTGGTGGAGTATTTG-3' (SEC ID N°: 1)

R1: 5'-TGAAAATGGTCAGAGAAACC-3' (SEC ID N°: 2)

5 El producto amplificado por PCR resultante se clonó insertándolo en el vector pGEMT easy (Promega KK) de acuerdo con el protocolo asociado al mismo. A continuación, este se usó como el plásmido de tipo silvestre. Este plásmido se usó como plantilla para realizar la amplificación usando el conjunto de cebadores de F1 y R1 en condiciones de reacción de PCR convencionales, para obtener un fragmento génico de KRAS de tipo silvestre lineal. El fragmento de ADN resultante se purificó usando un kit de purificación por PCR (Qiagen) y se usó como plantilla en los experimentos siguientes.

### 3. Reacción de fotorreticulación de sondas de fijación con fragmento génico de KRAS de tipo silvestre

15 A tubos de 1,5 ml se añadieron 2 µl de 1 nmol/l de fragmento génico de KRAS de tipo silvestre, 2 µl de 10 µmol/l de sonda de fijación para cadena sentido de tipo silvestre (ODN09) y 2 µl de 10 µmol/l de sonda de fijación para cadena antisentido de tipo silvestre (ODN10) y se ajustó a un volumen total de 20 µl, a una concentración final de tampón 13PCR (10 mmol/l de Tris-HCl (pH 8,3), 50 mmol/l de KCl, 1,5 mmol/l de MgCl<sub>2</sub> y el 0,001 % (p/v) de gelatina). Además, se proporcionaron otros tubos a los que no se añadieron ODN y sus volúmenes se reemplazaron por agua estéril. Cada tubo se sometió a tratamiento térmico en un bloque térmico mantenido a 95 °C durante 3 minutos, se dejó en un bloque térmico mantenido a 55 °C durante 3 minutos y se irradió con UV-LED a 366 nm durante 5 segundos. Como control, se proporcionó una muestra no irradiada con luz a 366 nm.

### 20 4. Confirmación de la reacción de amplificación por PCR usando LightCycler

A 20 µl de cada preparación obtenida anteriormente se añadieron 80 µl de agua estéril y se mezcló bien y 5 µl de una parte alícuota de cada mezcla se usó como plantilla para realizar la reacción PCR usando los cebadores NF1 y NR1, así como un LightCycler (Roche). Se usó el LightCycler Fast Start DNA Master SYBER Green I (Roche) como reactivo de reacción PCR. Las secuencias de cebadores son las siguientes:

25 NF1: 5'-AACCTTATGTGTGACATGTTCTAA-3' (SEC ID N°: 3)

NR1: 5'-GTCCTGCACCAGTAATATGC-3' (SEC ID N°: 4)

(Resultados y discusión)

Los resultados se muestran en la figura 2. El eje vertical del gráfico indica intensidad de fluorescencia y el eje horizontal indica el número de ciclos de PCR.

30 Comparando la curva de amplificación de muestra de plantilla (4) a la que se añadieron los ODN y se realizó una fotoirradiación con la de la muestra de plantilla (3) a la que se añadieron los ODN pero no se realizó ninguna fotoirradiación, el valor del CP (cruce) de la muestra de plantilla irradiada con luz aumentó. Con respecto a las curvas de amplificación de las muestras de plantilla sin la adición de los ODN, la comparación de la muestra de plantilla (2) con fotoirradiación con la muestra de plantilla (1) sin fotoirradiación muestra que los valores de CP de ambas fueron aproximadamente los mismos. Con respecto a las curvas de amplificación de las muestras de plantilla sin la fotoirradiación, la comparación de la muestra de plantilla (3) con la adición de los ODN con la muestra de plantilla (1) sin la adición de ODN muestra que los valores de CP de ambas fueron aproximadamente los mismos. Se halló a partir de estos resultados que la reacción de amplificación génica por PCR no se inhibió realizando solo o bien la adición de los ODN o bien la fotoirradiación a 366 nm, y que la fijación se formó solo realizando una fotoirradiación a 366 nm en presencia de los ODN, y como resultado, la amplificación del fragmento génico de KRAS se inhibió. Además, dado que la amplificación génica pudo inhibirse formando la fijación frente a la molécula de plantilla antes de la reacción PCR, se confirmó que los ODN que se habían unido una vez con la molécula de plantilla no se disociaron entre sí (es decir, un estado de no equilibrio), incluso en las condiciones de temperatura a las que una formación de híbrido ordinaria se disocia entre sí. Además, pudo estimarse a partir de la comparación relativa de los valores de CP que aproximadamente el 97 % de la cantidad original de la plantilla se fotorreticuló con los ODN por medio de la reacción de fotorreticulación.

### «Ejemplo 2»

#### Evaluación de la inhibición de la amplificación por PCR con respecto al gen mutado

##### (Material y procedimientos)

#### 50 1. Preparación de fragmento génico de KRAS

Se introdujo la mutación de Gly12Ser, usando el kit basal de mutagénesis PrimeSTAR (marca registrada) (Takara-Bio), en el plásmido de tipo silvestre preparado en el ejemplo 1. Es decir, la base 34<sup>a</sup> "G" del gen Kras se cambió a "A"



por medio del procedimiento. A continuación, este se usó como el plásmido mutado. Este plásmido se usó como plantilla para realizar la amplificación usando el conjunto de cebadores de F1 y R1 descritos en el ejemplo 1-2 en condiciones de reacción de PCR convencionales, para obtener un fragmento génico de Kras mutado lineal. El fragmento de ADN resultante se purificó usando un kit de purificación por PCR (Qiagen) y se usó como plantilla en los experimentos siguientes.

2. Reacción de fotorreticulación de sondas de fijación con fragmento génico de KRAS mutado

A tubos de 1,5 ml se añadieron 2 µl de 1 nmol/l de fragmento génico de KRAS mutado, 2 µl de 10 µmol/l de ODN09 y 2 µl de 10 µmol/l de ODN10 y se ajustó a un volumen total de 20 µl, a una concentración final de tampón 13PCR. Las secuencias de las sondas de fijación fueron las mismas que se han descrito en el ejemplo 1. La reacción de fotorreticulación se realizó en las mismas condiciones que las descritas en el ejemplo 1-3. Como control, se proporcionó una muestra no irradiada con luz a 366 nm.

3. Confirmación de la reacción de amplificación por PCR usando LightCycler

La reacción de amplificación por PCR se realizó de un modo similar al descrito en el ejemplo 1-4.

(Resultados y discusión)

Los resultados se muestran en la figura 3. El eje vertical del gráfico indica intensidad de fluorescencia y el eje horizontal indica el número de ciclos de PCR.

Los valores de CP de la muestra fotoirradiada en presencia de los ODN y la muestra no fotoirradiada en presencia de los ODN fueron aproximadamente los mismos, y se observó una pequeña inhibición de amplificación por PCR. Dado que casi todos los ODN para la secuencia de tipo silvestre no se fotorreticularon con el fragmento génico mutado, se sugirió que el fragmento génico mutado podía amplificarse selectivamente.

«Ejemplo 3»

**Confirmación de la amplificación selectiva de ácido nucleico mutado**

**(Material y procedimientos)**

1. Preparación de muestra de mezcla de tipo silvestre y mutado de KRAS

Los fragmentos génicos de tipo silvestre y mutados de KRAS preparados respectivamente en los ejemplos 1 y 2 se mezclaron a una relación 99:1 para preparar  $10^7$  copias/ml de muestra de mezcla génica de KRAS.

2. Reacción de fotorreticulación con sondas de fijación

A tubos de 1,5 ml se añadieron 2 µl de la muestra de mezcla preparada, así como 2 µl de 10 µmol/l de ODN09 y 2 µl de 10 mmol/l de ODN10 como sondas de fijación y se ajustó a un volumen total de 20 µl, a una concentración final de tampón 13PCR. Las secuencias de las sondas de fijación fueron las mismas que las descritas en el ejemplo 1. La reacción de fotorreticulación se realizó en las mismas condiciones que las descritas en el ejemplo 1-3.

3. PCR después de la reacción de fotorreticulación y clonación de producto PCR

A 20 µl de cada líquido de reacción de fotorreticulación obtenido anteriormente se añadieron 80 µl de agua estéril y se usaron 5 µl de una parte alícuota de cada mezcla como plantilla para realizar una reacción PCR (35 ciclos) usando los cebadores NF1 y NR1 descritos en el ejemplo 1-4 en condiciones de PCR convencionales. El producto PCR se clonó insertándolo en el vector pGEMT easy (Promega KK) de acuerdo con el protocolo asociado al mismo. Las células de HB101 competentes (Takara-Bio) se transformaron con el plásmido resultante y se cultivaron en placas de LB ampicilina durante la noche para formar colonias de E. coli.

4. Confirmación de la relación de mezcla tipo silvestre/tipo mutado mediante secuenciación

Se realizó una reacción PCR usando 100 colonias como plantillas, así como los cebadores M13F y M13R, usando la secuencia del vector en condiciones de PCR convencionales. Estos productos PCR se usaron como plantillas para determinar la secuencia de nucleótidos de cada clon mediante un procedimiento de secuenciación directo. Los cebadores usados en la reacción de secuenciación fueron SP6 y T7 y se usó el kit de secuencia de ciclo BigDye Terminator V1.1 (Applied BioSystems) como reactivo de reacción de secuenciación.

A continuación se muestran las secuencias de cebadores:

M13F: 5'-CAGGGTTTTCCAGTCACGA-3' (SEC ID N° 5)

M13R: 5'-TCACACAGGAAACAGCTATG-3' (SEC ID N° 6)

SP6 : 5'-ATTTAGGTGACACTATAGAA-3' (SEC ID N° 7)

T7 : 5'-AATACGACTCACTATAGGG-3' (SEC ID N° 8)

(Resultados y discusión)

Con respecto a la muestra con la relación de mezcla (tipo silvestre/mutado) de 99/1 antes de la fotoirradiación, se confirmó que la relación de mezcla aumentó a 87/13 después de la fotoirradiación.

#### 5 «Ejemplo 4»

**Confirmación de la amplificación selectiva de gen mutado en caso de realización de una fotorreticulación en la reacción de amplificación por PCR**

**(Material y procedimientos)**

1. Preparación de la solución de reacción PCR

10 Se preparó la solución de reacción para PCR siguiente y se usó como solución de reacción para la amplificación génica:

Tampón PCR (10 mmol/l Tris-HCl (pH 8,3), 50 mmol/l de KCl, 1,5 mmol/l de MgCl<sub>2</sub> y 0,001 % (p/v) de gelatina);

200 µmol/l de cada dNTP (= dATP, dTTP, dCTP y dGTP) y 0,75 U/µl de AmpliTaq Gold (Applied Biosystems).

15 A la solución de reacción para amplificación génica se añadieron 0,2 µmol/l de NF1 y 0,2 µmol/l de NR1 como cebadores de amplificación. Posteriormente se añadieron 0,4 µmol/l de ODN9 y 0,4 µmol/l de ODN10 como sondas de fijación. Las secuencias de los cebadores de amplificación y las sondas de fijación fueron las mismas que las descritas en el ejemplo 1. La solución de reacción resultante para la amplificación génica se vertió en tubos discretos y se añadieron por separado 1 µl de 100 pmol/l de fragmento génico de KRAS de tipo silvestre y 1 µl de 100 pmol/l fragmento génico de KRAS mutado como cada plantilla a los tubos discretos para su uso en la reacción PCR siguiente. Cada  
20 fragmento génico usado como plantilla de esta reacción corresponde a 10<sup>7</sup> copias.

2. Implementación de la reacción PCR con reacción de fotorreticulación

La solución de reacción y cada fragmento génico plantilla se añadieron a tubos de 0,2 ml para la PCR tal como se ha descrito anteriormente y se realizó la PCR. La reacción PCR se realizó calentando a 94 °C durante 10 minutos, repitiendo un ciclo compuesto de reacciones a 94 °C durante 30 segundos, a 55 °C durante 30 segundos y a 72 °C  
25 durante 30 segundos 35 veces, y calentando a 72 °C durante 3 minutos. En todos los 35 ciclos, los tubos se irradiaron con luz a 366 nm durante 5 segundos, usando UV-LED, en cada etapa de hibridación a 55 °C durante 30 segundos para formar la fijación. Ambas soluciones de reacción se sometieron después de la PCR a electroforesis usando un gel de agarosa al 3 % y el gel se tiñó con bromuro de etidio para confirmar productos amplificados usando un transiluminador.

30 (Resultados y discusión)

Los resultados se muestran en la figura 4. No se detectó ningún producto amplificado por PCR derivado del fragmento génico de tipo silvestre mediante tinción con bromuro de etidio después de la electroforesis, mientras que se detectó un producto amplificado por PCR derivado del fragmento génico mutado. Se halló a partir de los  
35 resultados que la reacción de fotorreticulación con las sondas de fijación para tipo silvestre pudo reconocerse una ligera mutación tal como una sustitución de una base y esto provocó una diferencia en la cantidad de ácido nucleico amplificado mediante PCR entre las secuencias de tipo silvestre y la mutada. Se considera que puede establecerse un procedimiento para detectar selectivamente un ácido nucleico mutado con alta sensibilidad usando dichas sondas de fijación con alta especificidad.

**«Ejemplo 5»**

40 **Confirmación de la sensibilidad de detección de genes mutados en caso de realización de una fotorreticulación en la reacción de amplificación por PCR**

**(Material y procedimientos)**

1. Preparación de sondas de fijación fotorreticulantes

45 El punto de mutación Leu858 de un gen EGFR se seleccionó como el sitio diana, y se diseñó una sonda de fijación complementaria a la cadena sentido capaz de hibridarse con el sitio diana que tenía la secuencia de tipo silvestre. De forma similar se diseñó una sonda de fijación contra la cadena antisentido. Se introdujo el ácido nucleico fotorreticulante descrito en el ejemplo 1, CNVK, a las sondas de fijación en los sitios en los que las sondas de fijación no estaban fotorreticuladas entre sí. La síntesis de las sondas de fijación se encargó a FASMAC Co., Ltd. Las secuencias de las sondas de fijación se muestran en la tabla 2.

Tabla 2

Sonda de fijación	Secuencia	Comentarios
ODN11	CA <sup>CNV</sup> KTTT GGCCAGCCC	Complementaria a la cadena sentido de la secuencia de EGFR de tipo silvestre
ODN12	GA <sup>CNV</sup> KTTTGGGCTGGCCA	Complementaria a la cadena antisentido de la secuencia de EGFR de tipo silvestre

## 2. Preparación de fragmentos génicos de tipo silvestre y mutados en la región del exón 21 de EGFR

5 Se preparó ADN genómico humano a partir de sangre periférica de una persona sana mediante un procedimiento convencional. El ADN resultante se usó como plantilla para amplificar una región de exón 21 de EGFR que comprende el punto de mutación Leu858, usando cebadores exón 21F de EGFR y exón 21R de EGFR en condiciones de reacción PCR convencionales. Las secuencias de cebadores usados en la reacción de PCR son las siguientes:

exón 21F de EGFR: 5'-GCATGAACTACTTGGAGGAC-3' (SEC ID N° 9)

exón 21R de EGFR: 5'-ACCTAAAGCCACCTCCTTAC-3' (SEC ID N° 10)

10 El producto amplificado por PCR resultante se clonó insertándolo en el vector pGEMT easy (Promega KK) se acuerdo con el protocolo asociado al mismo. A continuación, este se usó como el plásmido de tipo silvestre. Después, se introdujo la mutación Leu858Arg usando el kit basal de mutagénesis PrimeSTAR (marca registrada) (Takara-Bio) en el plásmido de tipo silvestre. Es decir, la 2573<sup>a</sup> base "T" del gen EGFR se cambió a "G" mediante el procedimiento. A continuación, este se usó como el plásmido mutado.

15 Estos plásmidos se usaron como plantillas para realizar la amplificación usando el conjunto de cebadores de exón 21F de EGFR y exón 21R de EGFR descritos anteriormente en condiciones de reacción PCR convencionales, para obtener fragmentos génicos de tipo silvestre y mutados lineales de exón 21 de EGFR. Los fragmentos de ADN resultantes se purificaron usando el kit de purificación PCR (Qiagen).

20 Los porcentajes en peso de los fragmentos génicos de tipo silvestre y mutados purificados de exón 21 de EGFR se determinaron usando el espectrofotómetro NanoDrop (Thermo Scientific) y teniendo en cuenta la longitud de cada fragmento amplificado se calculó el número de copias de cada fragmento génico. Los fragmentos génicos de tipo silvestre y mutados se mezclaron como se muestra en la tabla 3 y estas muestras se usaron como plantillas en los experimentos siguientes.

Tabla 3

Tipo silvestre/mutado	Muestra a	Muestra b	Muestra c
Cantidades mezcladas (número de copias/4 ml)	10 <sup>6</sup> /10 <sup>4</sup>	10 <sup>6</sup> /10 <sup>3</sup>	10 <sup>6</sup> /0
Relación de mezcla	100 : 1	1000 : 1	1 : 0

## 3. Reacción de amplificación por PCR con reacción de fotorreticulación

25 Se preparó una solución de reacción para la amplificación génica que tenía la misma formulación que se describe en el ejemplo 4. A esta solución de reacción se añadieron 0,2 μmol/l de exón 21NF de EGFR y 0,2 μmol/l de exón 21NR de EGFR como cebadores de amplificación. Estas secuencias de cebadores son las siguientes:

exón 21NF de EGFR: 5'-CTTGGAGGACCGTCGCTTG-3' (SEC ID N° 11)

exón 21NR de EGFR: 5'-CCACCTCCTTACTTTGCCTC-3' (SEC ID N° 12)

30 Posteriormente se añadieron 0,4 μmol/l de ODN11 y 0,4 μmol/l de ODN12 como sondas de fijación a la solución de reacción para la amplificación génica.

35 A tubos de 0,2 ml para PCR se añadieron por separado 4 μl de cada mezcla de fragmentos génicos de plantilla con diferentes relaciones de mezcla y la solución de reacción para la amplificación génica se añadió posteriormente y se realizó la PCR. La reacción PCR se realizó calentando a 94 °C durante 10 minutos, repitiendo un ciclo compuesto de reacciones a 94 °C durante 30 segundos, a 55 °C durante 30 segundos y a 72 °C durante 30 segundos 35 veces, y calentando a 72 °C durante 3 minutos. En todos los 35 ciclos, los tubos se irradiaron con luz a 366 nm durante 5

segundos, usando UV-LED, en cada etapa de hibridación a 55 °C durante 30 segundos. Como controles se proporcionaron muestras no irradiadas con luz a 366 nm.

4. Confirmación del número de copias mediante reacción PCR usando LightCycler

5 Se vertieron partes alícuotas de los productos amplificados por PCR resultantes obtenidos en los ejemplos 5-3 en tubos y se diluyeron con agua estéril para preparar muestras diluidas de 100 veces a 100.000 veces. Se realizó una reacción PCR usando 5 ml de cada muestra como plantilla y los cebadores exón 21NF de EGFR y exón 21NR de EGFR, así como un LightCycler (Roche). Con respecto a esto, se proporcionaron series diluidas (número de copias =  $10^3$  a  $10^8$ ) del fragmento génico de tipo silvestre como patrón, y se sometieron a la reacción PCR al mismo tiempo. Se usó el LightCycler Fast Start DNA Master SYBER Green I (Roche) como reactivo de reacción PCR.

10 Después de la reacción PCR, se preparó una curva de calibración a partir de la curva de amplificación del patrón y se calculó el número de cada solución de muestra original a partir del valor de CP de cada muestra. En base a los valores resultantes, cada producto amplificado por PCR obtenido en el ejemplo 5-3 se diluyó con agua estéril a  $10^6$  copias/4  $\mu$ l.

5. Preparación de la solución de reacción para la PCR cuantitativa en tiempo real

15 Se preparó una solución de reacción para PCR cuantitativa en tiempo real mezclando los reactivos siguientes. Más particularmente, se añadieron 5 pmol de exón 21NF de EGFR y 5 pmol de exón 21NR de EGFR como cebadores de amplificación a 12,5  $\mu$ l de 23Premix Ex Taq (marca registrada) (Takara-Bio) y se añadieron posteriormente 2,5 pmol de sonda de detección de la mutación, de la que el extremo terminal estaba marcado de forma fluorescente. La secuencia de la sonda de detección de la mutación es la siguiente:

20 Sonda de detección de L858R: 5'-(6-FAM)tttggccGgcccaa(BHQ1)-3'. Las letras en minúscula de la secuencia representan ADN, la letra mayúscula C representa LNA, 6-FAM es un tinte fluorescente y BHQ1 es un inactivador, respectivamente. La síntesis de la sonda de detección de la mutación se encargó a IDT. Los volúmenes y las cantidades anteriores de la solución de reacción eran cantidades por muestra y se preparó una cantidad requerida de la solución de reacción.

25 6. Preparación de la solución de reacción para PCR de fijación PNA-LNA

A la solución de reacción para la PCR cuantitativa en tiempo real preparada en el ejemplo 5-5 se añadieron 12,5 pmol de PNA (L858c) como la muestra de fijación para L858R para preparar una solución de reacción para PCR de fijación PNA-LNA. La secuencia de PNA (L858c) es la siguiente:



30 La síntesis de PNA (L858c) se encargó a Panagene. El volumen superior de la solución de reacción fue una cantidad por muestra y se preparó una cantidad requerida de solución de reacción.

7. Confirmación de la sensibilidad de detección de genes mutados mediante PCR cuantitativa en tiempo real

35 Los productos amplificados por PCR irradiados con luz a 366 nm en los ejemplos 5-3 se diluyeron con la solución de reacción para PCR cuantitativa en tiempo real preparada en el ejemplo 5-5 a  $10^6$  copias/4  $\mu$ l según el procedimiento seguido en el ejemplo 5-4, y 4  $\mu$ l de cada dilución se añadió por separado como plantillas a pocillos. Se añadió agua destilada a los pocillos de modo que se obtuvieran 25  $\mu$ l de volumen final, y se realizó una PCR cuantitativa a tiempo real usando un LightCycler LC480 (Roche). Como controles, los productos amplificados por PCR no irradiados con luz a 366 nm en el ejemplo 5-3 se diluyeron a  $10^6$  copias/4  $\mu$ l según el procedimiento descrito en el ejemplo 5-4, y se realizó una PCR cuantitativa en tiempo real.

40 Com ejemplos comparativos, los productos amplificados por PCR no irradiados con luz a 366 nm en los ejemplos 5-3 se diluyeron con la solución de reacción para PCR de fijación PNA-LNA preparada en el ejemplo 5-6 a  $10^6$  copias/4  $\mu$ l según el procedimiento seguido en el ejemplo 5-4, y 4  $\mu$ l de cada dilución se añadieron por separado como plantillas a pocillos. Se añadió agua destilada a los pocillos de modo que se obtuvieran 25  $\mu$ l de volumen final, y se realizó una PCR cuantitativa a tiempo real al mismo tiempo. La PCR se realizó calentando a 95 °C durante 10 segundos y repitiendo un ciclo compuesto de reacciones a 95 °C durante 3 segundos y a 56 °C durante 30 segundos 45 veces.

(Resultados y discusión)

50 Los resultados se muestran en las figuras 5 a 7. El eje vertical de cada gráfico indica intensidad de fluorescencia y el eje horizontal indica el número de ciclos de PCR. La figura 5 muestra el resultado de las muestras en las que no se realizó la reacción de fotorreticulación durante la reacción de amplificación por PCR (control). La figura 6 muestra los resultados de las muestras en las que la reacción de PCR de fijación de PNA-LNA se realizó con respecto a las muestras de control (es decir, las muestras en las que la reacción de fotorreticulación no se realizó durante la reacción de amplificación por PCR) (ejemplo comparativo). La figura 7 muestra los resultados de las muestras en las que se realizó la reacción de fotorreticulación (la presente invención). Los símbolos "a" a "c" indican las relaciones de mezcla de los genes de tipo silvestre y mutados usados como plantillas en cada reacción PCR. El símbolo "a" es

- 100:1, "b" es 1000:1 y "c" es el gen de tipo silvestre solo. Como se muestra en la figura 5, en las muestras en las que no se realizó la reacción de fotorreticulación ni la reacción de PCR de fijación PNA-LNA, incluso cuando la cantidad del gen mutado mezclado fue de 1/100 (a), se observó una pequeña diferencia con la señal (fondo) del gen de tipo silvestre solo (c), y el gen mutado no pudo detectarse. En la muestra en la que se realizó la reacción de PCR de fijación PNA-LNA, cuando la cantidad del gen mutado mezclado era 1/100 (a), la señal pudo detectarse, pero cuando la cantidad fue 1/1000 (b), no se observó diferencia con la señal del gen de tipo silvestre solo (c). Es decir, la sensibilidad de la detección del gen mutado fue del 1 %. Por otra parte, en las muestras en las que se realizó la reacción de fotorreticulación con luz a 366 nm (figura 7), incluso cuando la cantidad del gen mutado mezclado fue de 1/1000 (d), pudo detectarse suficiente señal y la sensibilidad de la detección se confirmó que era del 0,1 %.
- 5
- 10 Se reveló a partir de los resultados anteriores que según la presente invención, usando la reacción de fotorreticulación, el gen EGFR mutado que incluye la mutación puntual contenido en un conjunto de genes pudo detectarse, incluso cuando la relación de mezcla era del 0,1 %. Teniendo en cuenta el hecho de que la limitación de la sensibilidad de detección fiable era aproximadamente del 10 % en un procedimiento convencional tal como inmunotransferencia Southern o secuenciación directa, y de que la limitación de la sensibilidad de detección de la mutación era del 1 % en el procedimiento de PCR de fijación PNA-LNA, que se realizó como ejemplos comparativos, el procedimiento de detección de un gen mutado de la presente invención tiene una sensibilidad de detección extremadamente alta.
- 15

En el procedimiento de PCR de fijación PNA-LNA, la sensibilidad de detección de la mutación se mejora usando un efecto de competencia entre PNA (sonda de fijación) y LNA (sonda de detección de la mutación). Es decir, la formación de la fijación y la reacción de detección se realizan al mismo tiempo. Cuando se usa la reacción de fotorreticulación, la formación de la fijación y la reacción de detección pueden realizarse independientemente, como se muestra en los ejemplos, la mutación puede detectarse con alta sensibilidad incluso mediante una PCR cuantitativa en tiempo real convencional que no usa dicho efecto de competencia. Se considera que este hecho puede lograrse dejando que la unión de la sonda de fijación fotorreticulante con la molécula de plantilla esté en un estado de no equilibrio y muestra la superioridad de la presente invención.

20

25

#### Aplicabilidad Industrial

Según la presente invención, puede detectarse una pequeña cantidad de gen mutado que está contenido en genes de tipo silvestre con alta especificidad y alta sensibilidad. La presente invención permite la detección temprana de cáncer, o una terapia personalizada para la evaluación de la eficacia de un fármaco, dirigiéndose a una mutación conocida reconocida como la causa del cáncer, o una mutación conocida en la que se ha sugerido una relación con la eficacia del fármaco. La presente invención permite una detección a partir de una muestra de sangre o similar que se recoja de un paciente con cáncer y que contenga una pequeña cantidad de moléculas de ácido nucleico mutadas. La presente invención permite la confirmación de efectos de tratamiento, o ensayos de seguimiento, que habían sido realmente difíciles debido solo a especímenes muy invasivos, tales como muestras de biopsia o tejidos cancerosos recogidos por cirugía, pueden manipularse mediante un procedimiento convencional, y la presente invención es industrialmente útil.

30

35

#### Texto libre en listado de secuencias

Las secuencias de nucleótidos de SEC ID N° 5 a 8 del listado de secuencias son secuencias de cebadores.

#### Listado de secuencias

- 40 <110> Mitsubishi Chemical Medience Corporation
- <120> Procedimiento de inhibición de la amplificación de ácidos nucleicos mediante fotoirradiación y procedimiento de amplificación selectiva de ácidos nucleicos con alta sensibilidad
- <130> MCM-891
- <150> JP 2010-203054
- 45 <151> 2010-09-10
- <160> 12
- <170> PatentIn versión 3.5
- <210> 1
- <211> 22
- 50 <212> ADN
- <213> Homo sapiens

<400> 1  
 aaaggctactg gtaggatt tg 22

5 <210> 2  
 <211> 20  
 <212> ADN  
 <213> Homo sapiens

10 <400> 2  
 tgaaaatggt cagagaaacc 20

<210> 3  
 <211> 24

15 <212> ADN  
 <213> Homo sapiens

<400> 3  
 aaccttatgt gtagcatggt ctaa 24

20 <210> 4  
 <211> 20  
 <212> ADN  
 <213> Homo sapiens

25 <400> 4  
 gtctgcacc agtaatgctc 20

<210> 5  
 <211> 20

30 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial

<220>  
 <223> Descripción de secuencia artificial: cebador

35 <400> 5

ES 2 558 007 T3

cagggtttc ccagtcacga 20

<210> 6  
<211> 20  
5 <212> ADN  
<213> Secuencia artificial

<220>  
<223> Descripción de secuencia artificial: cebador  
10

<400> 6  
tcacacagga aacagctatg 20

<210> 7  
15 <211> 20  
<212> ADN  
<213> Secuencia artificial

<220>  
20 <223> Descripción de secuencia artificial: cebador

<400> 7  
atttagtga cactatagaa 20

<210> 8  
25 <211> 19  
<212> ADN  
<213> Secuencia artificial

<220>  
30 <223> Descripción de secuencia artificial: cebador

<400> 8  
aatagactc actataggg 19

<210> 9  
35 <211> 20  
<212> ADN

<213> Homo sapiens  
  
 <400> 9  
 gcatgaacta cttggaggac 20  
 5  
  
 <210> 10  
 <211> 20  
 <212> ADN  
 <213> Homo sapiens  
 10  
  
 <400> 10  
 acctaaagcc acctccttac 20  
  
 <210> 11  
 15 <211> 19  
 <212> ADN  
 <213> Homo sapiens  
  
 <400> 11  
 20 cttggaggac cgtcgcttg 19  
  
 <210> 12  
 <211> 20  
 <212> ADN  
 25 <213> Homo sapiens  
  
 <400> 12  
 ccacctcctt acttgcctc 20



**REIVINDICACIONES**

1. Un procedimiento de detección de un ácido nucleico mutado que comprende las etapas de:
  - (a) permitir a
    - 5 una sonda de fijación que comprende un ácido nucleico fotorreticulante y que tiene una secuencia complementaria a un sitio diana que tiene una secuencia de un ácido nucleico de tipo silvestre, y
    - a una muestra de ácido nucleico,
    - coexistir entre sí, y formar específicamente un híbrido de la sonda de fijación con una molécula de ácido nucleico de tipo silvestre que tiene el sitio diana;
  - 10 (b) fotorreticular la sonda de fijación/molécula de ácido nucleico diana que forman el híbrido mediante fotoirradiación;
  - (c) someter el producto de reacción obtenido en las etapas (a) y (b) a una reacción de amplificación de ácidos nucleicos, y
  - (d) analizar el producto amplificado resultante,
    - 15 en el que una región de detección que comprende un sitio diana del ácido nucleico mutado se amplifica selectivamente para detectar la presencia o la ausencia del ácido nucleico mutado.
  
2. Un procedimiento de detección de un ácido nucleico mutado que comprende las etapas de:
  - (a) permitir a
    - 20 una sonda de fijación que comprende un ácido nucleico fotorreticulante y que tiene una secuencia complementaria a un sitio diana que tiene una secuencia de un ácido nucleico de tipo silvestre, y
    - a una muestra de ácido nucleico.
    - coexistir entre sí, y formar específicamente un híbrido de la sonda de fijación con una molécula de ácido nucleico de tipo silvestre que tiene el sitio diana;
  - (b) fotorreticular la sonda de fijación/molécula de ácido nucleico diana que forman el híbrido mediante fotoirradiación;
  - 25 (c) realizar las etapas (a) y (b) durante una reacción de amplificación de ácidos nucleicos y
  - (d) analizar el producto amplificado resultante,
    - en el que una región de detección que comprende un sitio diana del ácido nucleico mutado se amplifica selectivamente para detectar la presencia o la ausencia del ácido nucleico mutado.
  
3. El procedimiento según una cualquiera de las reivindicaciones 1 o 2, en el que la reacción de amplificación de ácidos nucleicos es un procedimiento de PCR.
4. El procedimiento según una cualquiera de las reivindicaciones 1 o 2, en el que la reacción de amplificación de ácidos nucleicos es un procedimiento de PCR en tiempo real.
5. El procedimiento según una cualquiera de las reivindicaciones 1 o 2, en el que la sonda de fijación tiene una secuencia complementaria a la cadena sentido y/o la cadena antisentido de la molécula de ácido nucleico diana.
- 35 6. El procedimiento según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, en el que la longitud de cadena de la sonda de fijación es de 7 a 30 nucleótidos.
7. El procedimiento según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, en el que la fotoirradiación se realiza a una longitud de onda de 350 a 380 nm.
- 40 8. El procedimiento según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, en el que la fotoirradiación se realiza una o más veces en un ciclo de temperatura en el que las cadenas complementarias ordinarias se unen y se disocian entre sí, a una temperatura en la que las cadenas complementarias pueden unirse entre sí.
9. El procedimiento según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, en el que la fotoirradiación se realiza usando un aparato de amplificación de ácidos nucleicos con una unidad de fotoirradiación a una longitud de onda de 350 a 380 nm.
- 45

10. Uso de un kit para detectar un ácido nucleico mutado en un procedimiento según las reivindicaciones 1-9, que comprende:
- 5 una sonda de fijación que comprende un ácido nucleico fotorreticulante y que tiene una secuencia complementaria a un sitio diana que tiene una secuencia de un ácido nucleico de tipo silvestre, y
- un cebador capaz de amplificar una región de detección que comprende un sitio diana,
- en el que una región de detección que comprende un sitio diana del ácido nucleico mutado se amplifica selectivamente para detectar la presencia o la ausencia del ácido nucleico mutado.
11. Uso de un aparato de amplificación de ácidos nucleicos con una unidad de fotoirradiación a una longitud de onda de 350 a 380 nm para detectar un ácido nucleico mutado en un procedimiento según las reivindicaciones 1-9.
- 10 12. Uso de un aparato de amplificación de ácidos nucleicos con una unidad de fotoirradiación a una longitud de onda de 350 a 380 nm para detectar un ácido nucleico mutado que comprende las etapas de:
- (a) permitir a
- 15 una sonda de fijación que comprende un ácido nucleico fotorreticulante y que tiene una secuencia complementaria a una sitio diana, y
- a una muestra de ácido nucleico,
- coexistir entre sí, y formar específicamente un híbrido de la sonda de fijación con una molécula de ácido nucleico que tiene el sitio diana;
- (b) fotorreticular la sonda de fijación/molécula de ácido nucleico diana que forman el híbrido mediante fotoirradiación, y
- 20 (c) someter el producto de reacción obtenido en las etapas (a) y (b) a una reacción de amplificación de ácidos nucleicos.
13. Uso de un aparato de amplificación de ácidos nucleicos con una unidad de fotoirradiación a una longitud de onda de 350 a 380 nm para detectar un ácido nucleico mutado que comprende las etapas de:
- 25 (a) permitir a
- una sonda de fijación que comprende un ácido nucleico fotorreticulante y que tiene una secuencia complementaria a una sitio diana, y
- a una muestra de ácido nucleico,
- 30 coexistir entre sí, y formar específicamente un híbrido de la sonda de fijación con una molécula de ácido nucleico que tiene el sitio diana;
- (b) fotorreticular la sonda de fijación/molécula de ácido nucleico diana que forman el híbrido mediante fotoirradiación, y
- (c) realizar las etapas (a) y (b) durante una reacción de amplificación de ácidos nucleicos.

Figura 1

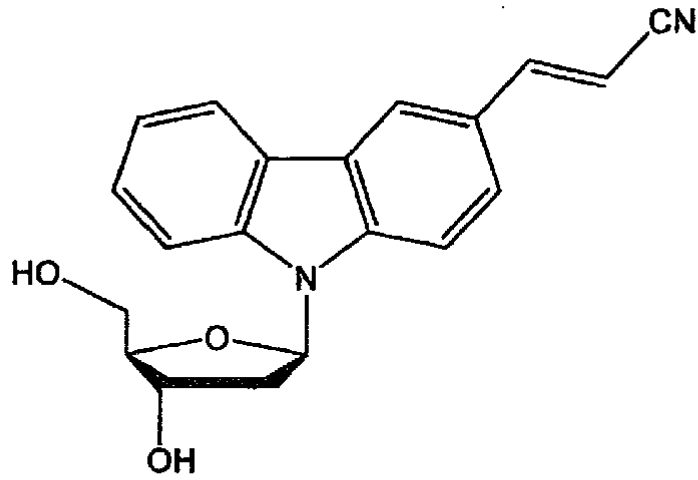
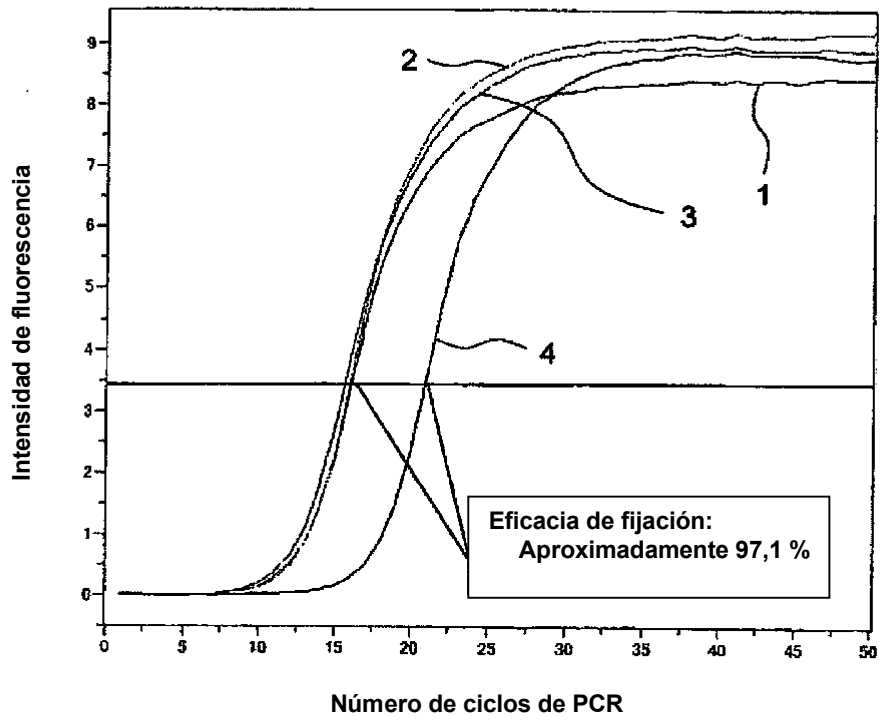
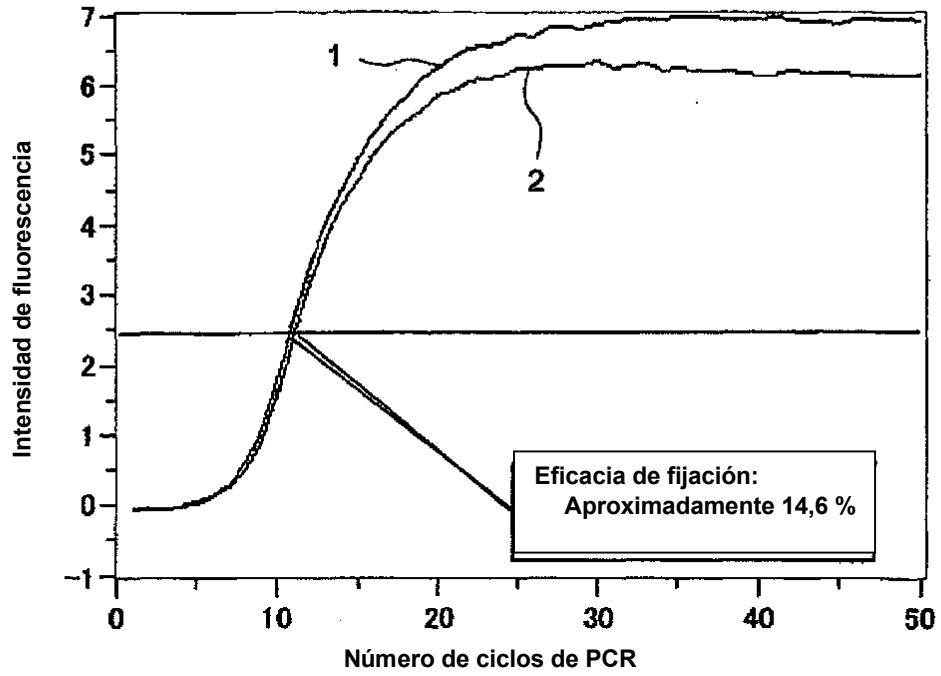


Figura 2



Tipo silvestre ODN (-), Fotoirradiación (-)	valor de CP 9,2
Tipo silvestre ODN (-), Fotoirradiación (+)	valor de CP 9,1
Tipo silvestre ODN (+), Fotoirradiación (-)	valor de CP 9,0
Tipo silvestre ODN (+), Fotoirradiación (+)	valor de CP 14,1

Figura 3



Tipo mutado ODN (+), Fotoirradiación (-) valor de CP 9,3  
Tipo mutado ODN (+), Fotoirradiación (+) valor de CP 9,6

Figura 4

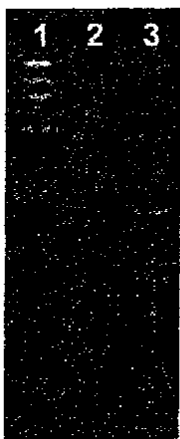


Figura 5

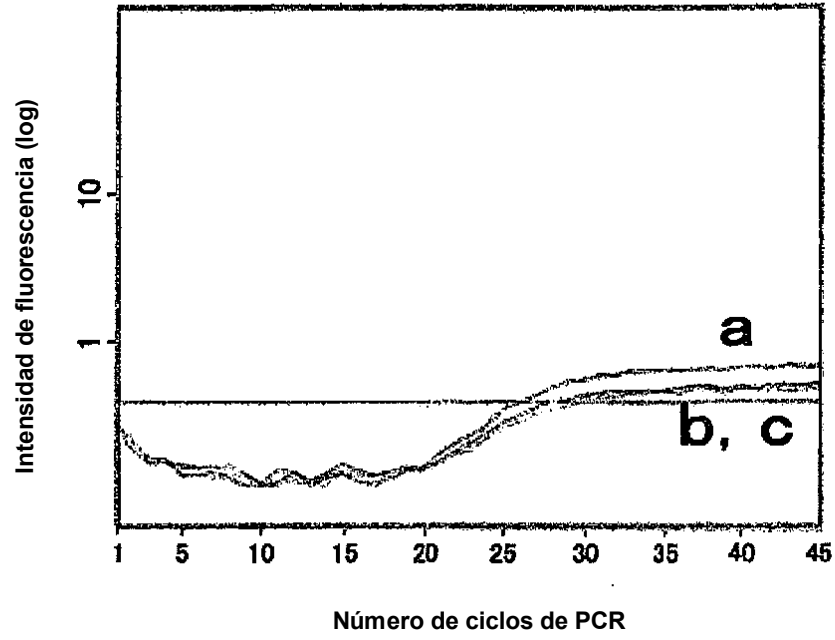


Figura 6

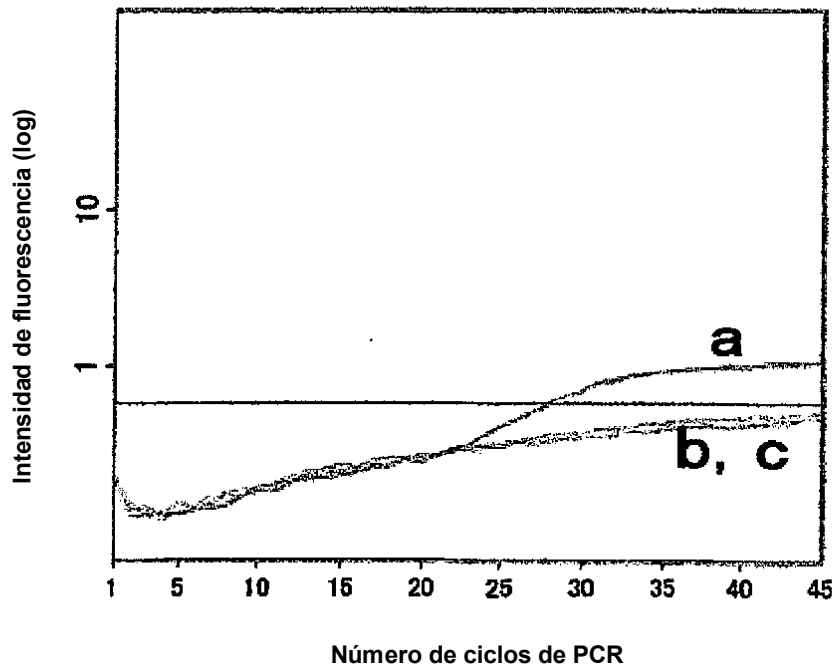


Figura 7

