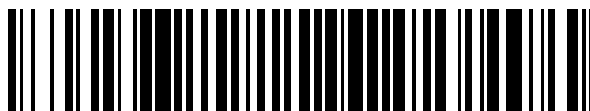


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 701 235**

51 Int. Cl.:

C12Q 1/6858 (2008.01)
C07H 19/06 (2006.01)
C07H 19/16 (2006.01)
C07H 19/02 (2006.01)
C07H 19/04 (2006.01)
C07H 21/02 (2006.01)
C07H 21/04 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **27.09.2013 PCT/JP2013/076329**
- 87 Fecha y número de publicación internacional: **03.04.2014 WO14051076**
- 96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **27.09.2013 E 13841056 (8)**
- 97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **12.09.2018 EP 2902499**

54 Título: **Método de abrazadera de BNA**

30 Prioridad:

28.09.2012 JP 2012217657

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
21.02.2019

73 Titular/es:

**BNA INC. (100.0%)
7-20, Saito-Asagi 7-chome
Ibaraki-shi, Osaka 567-0085, JP**

72 Inventor/es:

**IMANISHI, TAKESHI;
ORITA, AYAKO y
BAN, IKUYA**

74 Agente/Representante:

ELZABURU, S.L.P

ES 2 701 235 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

Método de abrazadera de BNA

Campo técnico

5 La presente invención se refiere a un método para detectar una diferencia en las secuencias de bases de ácidos nucleicos, y a un kit para ello. Más específicamente, la presente invención se refiere a un método para detectar una diferencia en las secuencias de bases usando un ácido nucleico abrazadera en técnicas de amplificación de ácido nucleico, y un kit para ello.

Técnica anterior

10 Una mutación genética adquirida en células somáticas a veces es altamente responsable, junto con mutaciones genéticas congénitas en células germinales, de la susceptibilidad a cierto tipo de enfermedad, un efecto terapéutico de un fármaco, la fuerza de los efectos secundarios y similares. En las células de cáncer, se producen diversas mutaciones genéticas a nivel de células somáticas, y las mutaciones desencadenan el cáncer y tienen una gran influencia en la eficacia de la respuesta de fármacos de dianas moleculares. En el cáncer de pulmón no microcítico, por ejemplo, cuando el gen EGFR está mutado, la eficacia de la respuesta de gefitinib (nombre comercial Iressa), que es un tipo de fármaco de dianas moleculares, se vuelve alta y, cuando no está mutado, la eficacia de la respuesta se vuelve baja. En el cáncer colorrectal, cuando el gen KRAS está mutado, la eficacia de la respuesta de un fármaco de diana molecular cetuximab (nombre comercial Erbitax) se vuelve baja y, cuando no está mutada, la eficiencia de la respuesta se convierte en alta. Por consiguiente, cuando se aplica una terapia con un fármaco de diana molecular a estas enfermedades, se requiere cada vez más un examen previo de la presencia o ausencia de una mutación del gen.

25 Hay principalmente dos tipos de métodos para detectar un ácido nucleico diana de detección (gen mutado) en células somáticas. Uno de ellos es un método de detección que incluye amplificación no selectiva de un gen mutado y una detección de ácido nucleico no diana (gen de tipo natural), después de lo cual se distingue el gen mutado del gen de tipo natural. Este método de detección incluye varios métodos, tales como un método que usa electroforesis, un método que usa hibridación y similares (véase, por ejemplo, el documento no de patente 1). En la mayoría de los métodos, sin embargo, es difícil la detección de una pequeña cantidad de un gen mutado contenido en un gen de tipo natural con suficiente sensibilidad y precisión. Por ejemplo, un método de detección general de un gen mutado es el método dideoxi de secuenciación. Aunque el método dideoxi de secuenciación permite la detección de un solo gen mutado presente, con una sensibilidad comparativamente alta, cuando un gen mutado está contenido en una cantidad en trazas en un gen de tipo natural, la detección solo es posible cuando el gen mutado está contenido en aproximadamente 10%. Aunque el método de pirosecuenciación es superior al método dideoxi de secuenciación, su sensibilidad de detección es de aproximadamente 5% (véase, por ejemplo, el documento no de patente 2). Además, se ha desarrollado un método que incluye amplificar una muestra mixta de genes mutados y de tipo natural por PCR, dibujar una curva de fusión de un ADN bicatenario de su producto de amplificación, y determinar la proporción del gen mutado a partir de la diferencia en las curvas de fusión del gen mutado y el gen de tipo natural. Incluso con este método, la sensibilidad de detección de un gen mutado contenido en un gen de tipo natural es de aproximadamente 5% (véase, por ejemplo, el documento no de patente 3).

40 Otro método para detectar un gen mutado en células somáticas es un método que incluye distinguir un gen de tipo natural de un gen mutado en la etapa de amplificación del gen. Específicamente, el método incluye la amplificación selectiva de un solo gen mutado.

45 Por ejemplo, incluye un método llamado "PCR enriquecida con mutantes", en donde un gen de tipo natural solo se escinde con una enzima de restricción, y un gen mutado no escindido solo se amplifica (p. ej., documento no de patente 4). Se considera que este método puede detectar 1 molécula de un gen mutado en 10^6 moléculas de un gen de tipo natural por repetición de una reacción para amplificar el gen mutado (véase, por ejemplo, el documento no de patente 5). Aunque este método es superior en sensibilidad alta como se ha mencionado antes, no se puede aplicar a diagnósticos generales ya que la operación es muy complicada.

50 En una reacción de elongación de los cebadores en la PCR y similares, se ha desarrollado un método que incluye la amplificación distinguiendo una diferencia en una sola base. Este método se denomina "ARMS (sistema de mutación refractario a la amplificación)" (véase, por ejemplo, el documento no de patente 6), "ASPCR (PCR específica de alelo)" (véase, por ejemplo, documento no de patente 7) y similares. Este método es un método superior, ya que tiene una sensibilidad comparativamente alta, no requiere una operación distinta de las reacciones de amplificación por PCR generales, puede realizar reacciones completas en un sistema cerrado, es muy conveniente y está exento de contaminación. Sin embargo, cuando un gen de tipo natural se amplifica incluso una vez debido a la distinción errónea de una sola base, el riesgo de falso positivo se vuelve alto, puesto que también se amplifica un gen de tipo natural, como la amplificación del gen mutado en la posterior reacción de amplificación. Cuando se usa este método, las condiciones de reacción, es decir, la temperatura de reacción, la concentración de sal y similares, deben controlarse estrictamente, y la cantidad de moldes debe ser exactamente la misma (véase, por ejemplo, p. ej., el documento no de patente 1), y por lo tanto, el método no es adecuado para ensayos clínicos para examinar un gran

número no especificado de muestras, y el diagnóstico requiere una alta precisión.

En las técnicas de amplificación de ácidos nucleicos, tales como la PCR y similares, otro método de amplificación que incluye distinguir diferencias en las bases es una técnica para inhibir la amplificación de un gen de tipo natural usando un oligonucleótido artificial que tiene un tipo y longitud adecuados de una estructura completamente complementaria a un gen de tipo natural, o lo que se llama un "método de abrazadera". Se requiere un material para un ácido nucleico abrazadera para, en un proceso de amplificación de ácido nucleico, (i) hibridar fuertemente con un gen de tipo natural, (ii) no hibridar fuertemente con un gen mutado, y (iii) resistir la descomposición en un proceso de amplificación del ácido nucleico. Por consiguiente, el ADN y el ARN compuestos de un material natural no son adecuados en términos de capacidad de hibridación y resistencia a la descomposición, y ácidos nucleicos artificiales tales como ácido nucleico peptídico (PNA) y ácido nucleico bloqueado (LNA) se usan exclusivamente como un material para el ácido nucleico abrazadera para la técnica de la abrazadera (véase, por ejemplo, p. ej., documentos no de patentes 1, 2).

El PNA es un ácido nucleico artificial usado en general como un tipo totalmente modificado y tiene propiedades deseables como ácido nucleico abrazadera, puesto que muestra una capacidad de hibridación más fuerte para una cadena de ADN que tiene una estructura complementaria que el ADN natural, muestra una buena diferencia con la capacidad de hibridación a una cadena de ADN que tiene una secuencia con emparejamiento erróneo de una base, y exenta de degradación por nucleasas. Como tal, se usa con frecuencia como un ácido nucleico abrazadera para el análisis y detección de varias mutaciones de varios genes. Por otro lado, el LNA es un ácido nucleico artificial usado como un tipo parcialmente modificado. Dado que cada modificación de una unidad mejora notablemente la capacidad de hibridación, se puede controlar por la longitud y modo de modificación para adquirir la capacidad de hibridación adecuada. Como tal, se puede proporcionar un efecto abrazadera usando un oligonucleótido LNA comparativamente corto.

Sin embargo, los ácidos nucleicos abrazadera mencionados antes tienen todas dificultades. Incluso aunque el PNA "muestra una capacidad de hibridación más alta que el ADN natural", su nivel es limitado y el ácido nucleico abrazadera se debe alargar para adquirir una buena capacidad de hibridación y presentar un efecto abrazadera suficiente. Además, aunque el LNA está completamente exento de problemas relacionados con la capacidad de hibridación, su estabilidad química en el proceso de amplificación plantea problemas, ya que su resistencia a las nucleasas no es muy fuerte y, en general, el LNA no es totalmente superior en capacidad de abrazadera.

El documento no de patente 12 describe un análisis de mutaciones muy sensible en el gen KRAS usando quimeras de LNA/ADN como bloqueadores de amplificación por PCR de alelos de tipo natural.

Los autores de la presente invención han desarrollado, después del desarrollo de 2',4'-BNA (LNA), que es un ácido nucleico artificial nuevo de tipo de estructura de reticulación (BNA de primera generación) (p. ej., documento de patente 3), BNA de segunda generación y sucesivos, tales como 3'-amino-2',4'-BNA, 5'-amino-2',4'-BNA, 2',4'-BNA^{COC}, 2',4'-BNA^{NC} y similares p. ej., documentos de patente 4 - 7).

Lista de documentos

Documentos de patentes

documento de patente 1: JP-B-4216266

documento de patente 2: JP-A-2006-304611

documento de patente 3: JP-B-3756313

documento de patente 4: JP-B-4731324

documento de patente 5: JP-B-4383178

documento de patente 6: JP-B-5030998

documento de patente 7: JP-B-4151751

Documento no de patentes

documento no de patente 1: Nollau et al., *Clinical Chemistry*, 1997, vol. 43, páginas 1114 - 1128

documento no de patente 2: Ogino et al., *The Journal of Molecular Diagnostics*, 2005, vol. 7, páginas 413 - 421

documento no de patente 3: Krypuy et al., *BMC Cancer*, 2006, vol. 6, página 295

documento no de patente 4: Chen et al., *Analytical biochemistry*, 1991, vol. 195, páginas 51 - 56

documento no de patente 5: Jacobson et al., *Oncogene*, 1994, vol. 9, páginas 553 - 563

documento no de patente 6: Newton et al., *Nucleic acids research*, 1989, vol. 17, páginas 2503 - 2516

documento no de patente 7: Wu et al., *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 1989, vol. 86 páginas 2757 - 2760

documento no de patente 8: Senescau et al., *Journal of Clinical Microbiology*, 2005, vol. 43, páginas 3304 - 3308

5 documento no de patente 9: Araki et al., *Journal of Molecular Diagnostics*, 2010, vol. 12, páginas 118 - 124

documento no de patente 10: Chiou et al., *Nature Protocol*, 2007, vol. 1, páginas 2604 - 2612

documento no de patente 11: Nordgard et al., *Diagnostic Molecular Pathology*, 2012, vol. 21, páginas 9 - 13

documento no de patente 12: Huang et al., *Mol. Cell. Probes*, 2010, Vol. 24, páginas 376-380

Resumen de la invención

10 Problemas a resolver por la invención

La presente invención se ha realizado en vista de la situación del campo técnico mencionada antes, y se dirige a proporcionar un método de ensayo conveniente y económico capaz de detectar la presencia o ausencia de un gen mutado y un modo de mutación con alta sensibilidad y alta precisión, de una muestra de ensayo que contiene principalmente un gen de tipo natural y que contiene un gen mutado solo en una cantidad en trazas.

15 Medios para resolver los problemas.

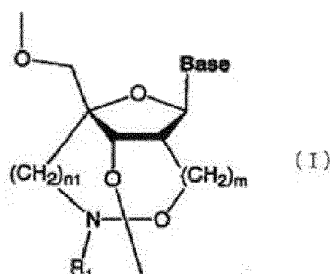
Los autores de la presente invención han llevado a cabo estudios intensivos en un intento por resolver el problema mencionado antes y, en particular, tomaron nota de un método de abrazadera de varios métodos de ensayo. Los autores de la presente invención concibieron además el uso de BNA de segunda generación y sucesivos como ácidos nucleicos abrazadera, y llevaron a cabo experimentos usando, como diana, muestras de ensayo modelo que contienen un gen de tipo natural y un gen mutado en varias proporciones conocidas. Como resultado, han encontrado que, usando BNA de segunda generación y sucesivas como ácidos nucleicos abrazadera, se puede amplificar de manera altamente selectiva un gen mutado incluso en una muestra de ensayo que contiene un gen mutado solo en una cantidad extremadamente pequeña en una gran cantidad de un gen de tipo natural y, específicamente, se puede detectar fácilmente la presencia de un gen mutado incluso cuando está presente solo en aproximadamente 0,1 - 1%. Los autores de la presente invención han encontrado además que la sensibilidad de detección del gen mutado se puede mejorar más (sensibilidad de detección de aproximadamente 0,01%) usando de forma combinada una sonda de detección que atrapa selectivamente el producto de amplificación del gen mutado diana. Los autores de la presente invención llevaron a cabo estudios adicionales basados en estos hallazgos y completaron la presente invención.

30 Por consiguiente, la presente invención proporciona lo siguiente.

[1] Un método para detectar un ácido nucleico diana que tiene una diferencia en una secuencia de bases en un sitio diana de detección en el ácido nucleico diana en una muestra de ensayo, en donde el ácido nucleico diana comprende al menos una diferencia en la secuencia de bases respecto a un ácido nucleico no diana de detección, que comprende

35 una etapa de amplificación selectiva de una región que contiene al menos una parte del sitio diana de detección del ácido nucleico diana de detección en la muestra de ensayo por un método de amplificación de ácido nucleico que usa un ácido nucleico abrazadera que tiene una secuencia de bases complementaria a la secuencia de bases del sitio diana de detección en el ácido nucleico no diana de detección, y

40 una etapa para detectar el ácido nucleico amplificado, en donde el ácido nucleico abrazadera es un análogo de oligonucleótido que contiene uno o más de uno o más tipos de estructuras unitarias de análogos de nucleósidos representadas por la siguiente fórmula (I):



en donde

Base es una base de ácido nucleico pirimidínica o púrica que tiene opcionalmente uno o más sustituyentes,

R₁ es un átomo de hidrógeno, un grupo alquilo, un grupo alqueno, un grupo cicloalquilo, un grupo arilo, un grupo aralquilo, un grupo acilo, un grupo sulfonilo, un grupo sililo, o un sustituyente de unidad de molécula funcional,

m es un número entero de 0 - 2, y

5 n₁ es un número entero de 1 - 3,

con la condición de que una forma de unión entre los análogos de nucleósidos respectivos en los análogos de oligonucleótidos contenga opcionalmente uno o más enlaces fosforotioato además de un enlace fosfodiéster y, cuando están contenidas dos o más de uno o más tipos de las estructuras unitarias mencionadas antes, la Base puede ser la misma o diferente entre las estructuras, o una de sus sales.

10 [2] El método de [1] mencionado antes, en donde el ácido nucleico abrazadera es un análogo de oligonucleótido que contiene uno o más de uno o más tipos de estructuras unitarias de análogos de nucleósidos de la fórmula (I) mencionada antes, en donde

15 Base es una base de ácido nucleico pirimidínica o púrica que tiene opcionalmente uno o más sustituyentes seleccionados del grupo que consiste en un grupo hidroxilo, un grupo hidroxilo protegido con un grupo protector para la síntesis de ácidos nucleicos, un grupo alcoxi que tiene de 1 a 5 átomos de carbono, un grupo mercapto, un grupo mercapto protegido con un grupo protector para la síntesis de ácidos nucleicos, un grupo alquiltio que tiene de 1 a 5 átomos de carbono, un grupo amino, un grupo amino protegido con un grupo protector para la síntesis de ácidos nucleicos, un grupo amino sustituido con un grupo alquilo que tiene de 1 a 5 átomos de carbono, un grupo alquilo que tiene de 1 a 5 átomos de carbono y un átomo de halógeno,

20 R₁ es un átomo de hidrógeno, un grupo alquilo que tiene de 1 a 5 átomos de carbono, un grupo bencilo, un grupo acetilo, un grupo benzoilo, un grupo metanosulfonilo o un grupo p-toluenosulfonilo,

m es un número entero de 0 - 2, y

n₁ es un número entero de 1 - 3,

o una de sus sales.

25 [3] El método de [1] o [2] mencionado antes, en donde el ácido nucleico abrazadera es un análogo de oligonucleótido que contiene uno o más de uno o más tipos de estructuras unitarias de análogos de nucleósidos de la fórmula (I) mencionada antes, en donde

30 Base es una base de ácido nucleico pirimidínica o púrica que tiene opcionalmente uno o más sustituyentes seleccionados del grupo que consiste en un grupo hidroxilo, un grupo hidroxilo protegido con un grupo protector para la síntesis de ácidos nucleicos, un grupo alcoxi que tiene de 1 a 5 átomos de carbono, un grupo mercapto, un grupo mercapto protegido con un grupo protector para la síntesis de ácidos nucleicos, un grupo alquiltio que tiene de 1 a 5 átomos de carbono, un grupo amino, un grupo amino protegido con un grupo protector para la síntesis de ácidos nucleicos, un grupo amino sustituido con un grupo alquilo que tiene de 1 a 5 átomos de carbono, un grupo alquilo que tiene de 1 a 5 átomos de carbono y un átomo de halógeno,

35 R₁ es un grupo metilo,

m es 0, y

n₁ es 1,

o una de sus sales.

40 [4] El método de uno cualquiera de [1] a [3] mencionados antes, en donde el ácido nucleico abrazadera tiene una longitud de 5 a 30 unidades monómeras.

[5] El método de uno cualquiera de [1] a [4] mencionados antes, en donde el método de amplificación de ácido nucleico es un método de reacción en cadena de la polimerasa (PCR), opcionalmente un método de PCR en tiempo real.

45 [6] El método de [1] a [5] mencionados antes, en donde el método de PCR es un método de PCR en tiempo real realizado usando una sonda de detección, y la sonda de detección es un ácido nucleico monocatenario que tiene una secuencia de bases complementaria a la secuencia de bases de la región donde se va a detectar una diferencia en una secuencia de bases en un sitio diana de detección, en donde un extremo está sustituido con un grupo de fluorescencia, el otro extremo está sustituido con un grupo de atenuación.

50 [7] El método de [6] mencionado antes, en donde la sonda de detección es un análogo de oligonucleótido que contiene uno o más de uno o más tipos de estructuras unitarias de análogos de nucleósidos de una cualquiera de la

fórmula (I) mencionada antes, o una de sus sales.

[8] El método de uno cualquiera de [1] a [7] mencionados antes, en donde:

5 (a) la diferencia en la secuencia de bases entre el ácido nucleico no diana de detección y el ácido nucleico diana de detección es causada por una o más mutaciones seleccionadas del grupo que consiste en sustitución, inserción, eliminación, inversión, superposición y translocación o una de sus combinaciones; y/o

(b) la etapa de detección del ácido nucleico amplificado comprende la secuenciación de un producto de amplificación; y/o

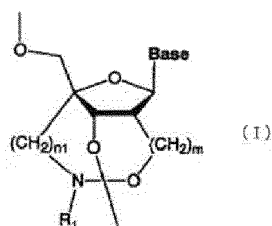
(c) el ácido nucleico diana es un gen, y la diferencia en la secuencia de bases del gen que es la diana de detección está relacionada con el inicio y/o sensibilidad al tratamiento de una enfermedad en particular.

10 [9] Un kit para la detección de un ácido nucleico diana que tiene una diferencia en una secuencia de bases en un sitio diana de detección en el ácido nucleico diana en una muestra de ensayo, en donde el ácido nucleico diana es un ácido nucleico diana de detección que tiene al menos una diferencia en una secuencia de bases respecto a un ácido nucleico no diana de detección, comprendiendo el kit

15 (a) un ácido nucleico abrazadera que tiene una secuencia de bases complementaria a la secuencia de bases del sitio diana de detección de un ácido nucleico no diana de detección, y

(b) un reactivo para amplificar selectivamente una región que contiene al menos una parte del sitio diana de detección del ácido nucleico diana de detección en la muestra de ensayo,

en donde el ácido nucleico abrazadera es un análogo de oligonucleótido que contiene uno o más de uno o más tipos de estructuras unitarias de análogos de nucleósidos representados por la siguiente fórmula (I):



20 en donde

Base es una base de ácido nucleico pirimidínica o púrica que tiene opcionalmente uno o más sustituyentes,

R₁ es un átomo de hidrógeno, un grupo alquilo, un grupo alqueno, un grupo cicloalquilo, un grupo arilo, un grupo aralquilo, un grupo acilo, un grupo sulfonilo, un grupo sililo, o un sustituyente de unidad de molécula funcional,

25 m es un número entero de 0 - 2, y

n₁ es un número entero de 1 - 3,

en donde B es como se ha definido antes,

30 con la condición de que una forma de unión entre los respectivos análogos de nucleósidos en los análogos de oligonucleótidos contenga opcionalmente uno o más enlaces fosforotioato además de un enlace fosfodiéster y, cuando están contenidas dos o más de uno o más tipos de las estructuras unitarias mencionadas antes, la Base puede ser la misma o diferente entre las estructuras, o una de sus sales.

[10] El kit de [9] mencionado antes, en donde el ácido nucleico abrazadera es un análogo de oligonucleótido que contiene uno o más de uno o más tipos de estructuras unitarias de análogos de nucleósidos de la fórmula (I) mencionada antes, en donde

35 Base es una base de ácido nucleico pirimidínica o púrica que tiene opcionalmente uno o más sustituyentes seleccionados del grupo que consiste en un grupo hidroxilo, un grupo hidroxilo protegido con un grupo protector para la síntesis de ácidos nucleicos, un grupo alcoxi que tiene de 1 a 5 átomos de carbono, un grupo mercapto, un grupo mercapto protegido con un grupo protector para la síntesis de ácidos nucleicos, un grupo alquiltio que tiene de 1 a 5 átomos de carbono, un grupo amino, un grupo amino protegido con un grupo protector para la síntesis de ácidos nucleicos, un grupo amino sustituido con un grupo alquilo que tiene de 1 a 5 átomos de carbono, un grupo alquilo que tiene de 1 a 5 átomos de carbono y un átomo de halógeno,

40 R₁ es un átomo de hidrógeno, un grupo alquilo que tiene de 1 a 5 átomos de carbono, un grupo bencilo, un grupo acetilo, un grupo benzoilo, un grupo metanosulfonilo o un grupo p-toluenosulfonilo,

m es un número entero de 0 - 2, y

n1 es un número entero de 1 - 3,

o una de sus sales.

5 [11] El kit de [9] o [10] mencionado antes, en donde el ácido nucleico abrazadera es un análogo de oligonucleótido que contiene uno o más de uno o más tipos de estructuras unitarias de análogos de nucleósidos de la fórmula (I) mencionada antes, en donde

10 Base es una base de ácido nucleico pirimidínica o púrica que tiene opcionalmente uno o más sustituyentes seleccionados del grupo que consiste en un grupo hidroxilo, un grupo hidroxilo protegido con un grupo protector para la síntesis de ácidos nucleicos, un grupo alcoxi que tiene de 1 a 5 átomos de carbono, un grupo mercapto, un grupo mercapto protegido con un grupo protector para la síntesis de ácidos nucleicos, un grupo alquiltio que tiene de 1 a 5 átomos de carbono, un grupo amino, un grupo amino protegido con un grupo protector para la síntesis de ácidos nucleicos, un grupo amino sustituido con un grupo alquilo que tiene de 1 a 5 átomos de carbono, un grupo alquilo que tiene de 1 a 5 átomos de carbono y un átomo de halógeno,

R₁ es un grupo metilo,

15 m es 0, y

n1 es 1,

o una de sus sales.

[12] El kit de uno cualquiera de [9] a [11] mencionados antes, en donde el ácido nucleico abrazadera tiene una longitud de 5 a 30 unidades monómeras.

20 [13] El kit de uno cualquiera de [9] a [12] mencionados antes, en donde el reactivo de (b) mencionado antes comprende un cebador de amplificación para la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), opcionalmente para una PCR en tiempo real.

25 [14] El kit de [13] mencionados antes, en donde el kit comprende además una sonda de detección, y la sonda de detección es un ácido nucleico monocatenario que tiene una secuencia de bases complementaria a la secuencia de bases de la región donde se va a detectar una diferencia en una secuencia de bases en un ácido nucleico diana de detección, en donde un extremo está sustituido con un grupo de fluorescencia, el otro extremo está sustituido con un grupo de atenuación, opcionalmente

30 en donde la sonda de detección es un análogo de oligonucleótido que contiene uno o más de uno o más tipos de estructuras unitarias de análogos de nucleósidos de una cualquiera de la fórmula (I) mencionada antes, o una de sus sales.

[15] El kit de uno cualquiera de [9] a [14] mencionados antes, en donde:

(a) la diferencia en la secuencia de bases entre el ácido nucleico no diana de detección y el ácido nucleico diana de detección es causada por una o más mutaciones seleccionadas del grupo que consiste en sustitución, inserción, eliminación, inversión, superposición y translocación o una de sus combinaciones; y/o

35 (b) ácido nucleico diana es un gen, y la diferencia en la secuencia de bases del gen que es la diana de detección está relacionada con el inicio y/o sensibilidad al tratamiento de una enfermedad en particular.

Efecto de la invención

40 La presente invención permite la detección altamente sensible y altamente precisa de la presencia o ausencia de un gen mutado y el modo de mutación, así como ensayos convenientes y precisos de mutación puntual, mutación de eliminación, mutación de inserción y similares de varios genes con bajo coste, incluso a partir de una muestra de ensayo que contiene solo una cantidad en trazas de un gen mutado (ácido nucleico diana de detección) en el ácido nucleico diana que es principalmente un gen de tipo natural (ácido nucleico no diana de detección).

Breve descripción de los dibujos

La figura 1 muestra la secuencia de bases y principales mutaciones del segundo exón del gen KRAS.

45 La figura 2 muestra una curva de amplificación de ácido nucleico mediante la sonda de confirmación de amplificación de todos los ácidos nucleicos (en lo sucesivo denominada "sonda de amplificación de ácido nucleico") (oligo 3) para la PCR en tiempo real de cada muestra de ensayo (muestra mixta de genes mutados/(mutados + tipo natural) (100% - 0%)) por un método de abrazadera de BNA que usa oligo 4 y se dirige a la mutación G12V del gen KRAS, que se obtiene en el ejemplo 1.

- La fig. 3 muestra una curva de amplificación de ácido nucleico mediante una sonda de amplificación de ácido nucleico (oligo 3) para la PCR en tiempo real de cada muestra de ensayo (muestra mixta de genes mutados/(mutados + tipo natural (100% - 0%)) por un método de abrazadera de BNA que usa oligo 5 y se dirige a la mutación G12V del gen KRAS, que se obtiene en el ejemplo 1.
- 5 La fig. 4 muestra una curva de amplificación de ácido nucleico mediante una sonda de amplificación de ácido nucleico (oligo 3) para la PCR en tiempo real de cada muestra de ensayo (muestra mixta de genes mutados/(mutados + tipo natural (100% - 0%)) por un método de abrazadera de BNA que usa oligo 6 y se dirige a la mutación G12V del gen KRAS, que se obtiene en el ejemplo 1.
- La fig. 5 muestra un diagrama de análisis de secuencia de bases cerca del codón 12 de un producto de amplificación después de 55 ciclos de amplificación de ácido nucleico por PCR en tiempo real de cada muestra de ensayo (muestra mixta de genes mutados/(mutados + tipo natural) (100% - 0%)) por un método de abrazadera de BNA que usa oligo 6 y se dirige a la mutación G12V del gen KRAS, que se obtiene en el ejemplo 1.
- 10 La fig. 6 muestra una curva de amplificación de ácido nucleico mediante una sonda de amplificación de ácido nucleico (oligo 3), que compara el efecto de abrazadera de oligo 5 (BNA) con el de oligo 8 (ADN), oligo 9 (LNA) y oligo 10 (PNA) por PCR en tiempo real de cada muestra de ensayo (muestra mixta de genes mutados/(mutados + tipo natural) (100% - 0%)) que se dirigen a la mutación G12V del gen KRAS, que se obtiene en el ejemplo 2.
- 15 La fig. 7 muestra una curva de amplificación de ácido nucleico mediante una sonda de amplificación de ácido nucleico (oligo 3), que compara el efecto de abrazadera de oligo 6 (BNA) con el de oligo 11 (ADN), oligo 12 (LNA) y oligo 13 (PNA) por PCR en tiempo real de cada muestra de ensayo (muestra mixta de genes mutados/(mutados + tipo natural) (100% - 0%)) que se dirigen a la mutación G12V del gen KRAS, que se obtiene en el ejemplo 2.
- 20 La fig. 8 muestra un gráfico del valor de ΔCt calculado a partir de una curva de amplificación de ácido nucleico mediante una sonda de amplificación de ácido nucleico (oligo 3), que compara el efecto abrazadera de oligo 5 (BNA) con el de oligo 8 (ADN), oligo 9 (LNA) y oligo 10 (PNA) por PCR en tiempo real de cada muestra de ensayo (muestra mixta de genes mutados/(mutados + tipo natural) (100% - 0%)) que se dirigen a la mutación G12V del gen KRAS, que se obtiene en el ejemplo 2.
- 25 La fig. 9 muestra un gráfico del valor de ΔCt calculado a partir de una curva de amplificación de ácido nucleico mediante una sonda de amplificación de ácido nucleico (oligo 3), que compara el efecto abrazadera de oligo 6 (BNA) con el de oligo 11 (ADN), oligo 12 (LNA) y oligo 13 (PNA) por PCR en tiempo real de cada muestra de ensayo (muestra mixta de genes mutados/(mutados + tipo natural) (100% - 0%)) que se dirigen a la mutación G12V del gen KRAS, que se obtiene en el ejemplo 2.
- 30 La fig. 10 muestra una curva de amplificación de ácido nucleico y un valor de Ct por una sonda de amplificación de ácido nucleico (oligo 3-2) para la PCR en tiempo real de cada muestra de ensayo (muestra mixta de genes mutados/(mutados + tipo natural) (100% - 0%)) por un método de abrazadera de BNA que usa oligo 6 y se dirige a la mutación del gen G12V de KRAS, que se obtiene en el ejemplo 3.
- La fig. 11 muestra una curva de amplificación de ácido nucleico y un valor de Ct por una sonda para detectar la mutación del oligo 15 para la PCR en tiempo real de cada muestra de ensayo (muestra mixta de genes mutados/(mutados + tipo natural) (100% - 0%)) por un método de abrazadera de BNA que usa oligo 6 y se dirige a la mutación G12V del gen KRAS, que se obtiene en el ejemplo 3.
- 35 La fig. 12 muestra una curva de amplificación de ácido nucleico y un valor de Ct por sondas de ADN y BNA de detección mutadas de 15 unidades monómeras cuando se usaba 1 pmol de ácido nucleico abrazadera (oligo 6) que se dirige a la mutación del gen G12V de KRAS, que se obtiene en el ejemplo 3. a) Seguimiento de oligo 14, b) seguimiento de oligo 15.
- 40 La fig. 13 muestra una curva de amplificación de ácido nucleico y un valor de Ct por sondas de ADN y BNA de detección mutadas de 10 unidades monómeras cuando se usaba 1 pmol de ácido nucleico abrazadera (oligo 6) que se dirige a la mutación del gen G12V de KRAS, que se obtiene en el ejemplo 3. a) Seguimiento de oligo 14-2, b) seguimiento de oligo 15-2.
- 45 La fig. 14 muestra una curva de amplificación de ácido nucleico por cada sonda (a: oligo 3-2 y b: oligo 14) para la PCR en tiempo real de cada muestra de ensayo (muestra mixta de genes mutados/(mutados + tipo natural) (10% - 0%)) por un método de abrazadera de BNA que usa oligo 6 y se dirige a la mutación G12V del gen KRAS, que se obtiene en el ejemplo 4.
- 50 La fig. 15 muestra una curva de amplificación de ácido nucleico por cada sonda (a: oligo 3-2 y b: oligo 16) para la PCR en tiempo real de cada muestra de ensayo (muestra mixta de genes mutados/(mutados + tipo natural) (10% - 0%)) por un método abrazadera de BNA que usa oligo 6 y se dirige a la mutación G12V del gen KRAS, que se obtiene en el ejemplo 4.
- 55 La fig. 16 muestra una curva de amplificación de ácido nucleico por cada sonda (a: oligo 3-2 y b: oligo 17) para la

PCR en tiempo real de cada muestra de ensayo (muestra mixta de genes mutados/(mutados + tipo natural) (10% - 0%)) por un método abrazadera de BNA que usa oligo 6 y se dirige a la mutación G13D del gen KRAS, que se obtiene en el ejemplo 4.

5 La fig. 17 muestra una curva de amplificación de ácido nucleico por cada sonda (a: oligo 3-2 y b: oligo 18) para la PCR en tiempo real de cada muestra de ensayo (muestra mixta de genes mutados/(mutados + tipo natural) (10% - 0%)) por un método abrazadera de BNA que usa oligo 6 y se dirige a la mutación G12A del gen KRAS, que se obtiene en el Ejemplo 4.

10 La fig. 18 muestra una curva de amplificación de ácido nucleico por cada sonda (a: oligo 3-2 y b: oligo 19) para la PCR en tiempo real de cada muestra de ensayo (muestra mixta de genes mutados/(mutados + tipo natural) (10% - 0%)) por un método abrazadera de BNA que usa oligo 6 y se dirige a la mutación G12C del gen KRAS, que se obtiene en el ejemplo 4.

15 La fig. 19 muestra una curva de amplificación de ácido nucleico por cada sonda (a: oligo 3-2 y b: oligo 20) para la PCR en tiempo real de cada muestra de ensayo (muestra mixta de genes mutados/(mutados + tipo natural) (10% - 0%)) por un método de abrazadera de BNA que usa oligo 6 y se dirige a la mutación G12S del gen KRAS, que se obtiene en el ejemplo 4.

La fig. 20 muestra una curva de amplificación de ácido nucleico por cada sonda (a: oligo 3-2 y b: oligo 21) para la PCR en tiempo real de cada muestra de ensayo (muestra mixta de genes mutados/(mutados + tipo natural) (10% - 0%)) por un método de abrazadera de BNA que usa oligo 6 y se dirige a la mutación G12R del gen KRAS, que se obtiene en el ejemplo 4.

20 La fig. 21 muestra una curva de amplificación de ácido nucleico por cada sonda (a: oligo 3-2 y b: oligo 14) para la PCR en tiempo real de cada muestra de ensayo (muestra mixta de genes mutados/(mutados + tipo natural) (1% - 0%)) por un método de abrazadera BNA que usa oligo 4-2 y se dirige a la mutación G12V del gen KRAS, que se obtiene en el ejemplo 5.

25 La fig. 22 muestra una curva de amplificación de ácido nucleico por cada sonda (a: oligo 3-2 y b: oligo 14) para la PCR en tiempo real de cada muestra de ensayo (muestra mixta de genes mutados/(mutados + tipo natural) (1% - 0%)) por un método de abrazadera de BNA que usa oligo 5 y se dirige a la mutación G12V del gen KRAS, que se obtiene en el ejemplo 5.

30 La fig. 23 muestra una curva de amplificación de ácido nucleico por cada sonda (a: oligo 3-2 y b: oligo 14) para la PCR en tiempo real de cada muestra de ensayo (muestra mixta de genes mutados/(mutados + tipo natural) (1% - 0%)) por un método de abrazadera de BNA que usa oligo 6 y se dirige a la mutación G12V del gen KRAS, que se obtiene en el ejemplo 5.

35 La fig. 24 muestra una curva de amplificación de ácido nucleico por cada sonda (a: oligo 24 y b: oligo 26) para la PCR en tiempo real de cada muestra de ensayo (muestra mixta de genes mutados/(mutados + tipo natural) (100% - 0%)) mediante un método abrazadera BNA que usa oligo 25 y que se dirige a la mutación del gen EGFR E746-A750 del (tipo 1), que se obtiene en el ejemplo 6.

La fig. 25 muestra un gráfico para la comparación de la función abrazadera entre la abrazadera de BNA (oligo 25) y otras abrazaderas (oligo 27 - 29) en la PCR en tiempo real de las respectivas muestras de ensayo (muestra mixta de genes mutados/(mutados + tipo natural) (100% - 0%)) dirigidos a la mutación del gen EGFR E746-A750 del (tipo 1) en el ejemplo 6.

40 Descripción de realizaciones

Método de detección

La presente invención proporciona un método para detectar un ácido nucleico diana que tiene una diferencia en una secuencia de bases en un sitio diana de detección en el ácido nucleico diana en una muestra de ensayo (en lo sucesivo, también se denominará el método de la presente invención). Como se usa en la presente memoria, el ácido nucleico diana es un ácido nucleico diana de detección que tiene al menos una diferencia en una secuencia de bases respecto a un ácido nucleico no diana de detección. El método de la presente invención incluye (1) la etapa de amplificar selectivamente una región que contiene al menos una parte del sitio diana de detección del ácido nucleico diana de detección en la muestra de ensayo mediante un método de amplificación que usa un ácido nucleico abrazadera que tiene una secuencia de bases complementaria de la secuencia de bases del sitio diana de detección de un ácido nucleico no diana de detección, y (2) una etapa de detección del ácido nucleico amplificado.

55 Una muestra de ensayo que sea la diana del método de la presente invención no está particularmente limitada siempre que se suponga que contiene un ácido nucleico para el que se desea la detección de mutación. La muestra de ensayo típicamente se puede recoger de mamíferos, preferiblemente seres humanos, e incluye muestras líquidas tales como sangre, líquido pleural, lavado de bronquios, líquido de médula ósea, líquido linfático y similares, y muestras sólidas como ganglios linfáticos, vasos sanguíneos, médula ósea, cerebro, bazo, piel y similares. Puesto

que el método de la presente invención puede detectar la mutación de un ácido nucleico con una sensibilidad muy alta, se puede usar una muestra líquida que contenga solo una cantidad en trazas de una muestra diana de ensayo, tal como sangre y similares, sin recoger directamente una muestra de, por ejemplo, una lesión como el cáncer y similares. Por lo tanto, las muestras de ensayo preferidas son muestras líquidas tales como sangre y similares.

- 5 El "ácido nucleico diana" en el método de la presente invención es un ácido nucleico que es la diana de la detección de una diferencia en una secuencia de bases, y se refiere a un ácido nucleico diana de detección que tiene al menos una diferencia en una secuencia de bases respecto a un ácido nucleico diana de detección (p. ej., un gen mutado) y un ácido nucleico no diana de detección (p. ej., un gen de tipo natural) en el sitio diana de detección. Aunque el ácido nucleico puede ser ADN o ARN, es preferiblemente un ADN, específicamente un gen. Un gen preferible es un gen que se sabe que tiene una diferencia en su secuencia de bases, es decir, mutación (preferiblemente, mutación adquirida), relacionada con el inicio y/o sensibilidad al tratamiento de una enfermedad particular. El "inicio" aquí incluye no solo el inicio real de la enfermedad, sino también el riesgo de inicio y similares, y la "sensibilidad al tratamiento" no solo la eficacia de la respuesta al tratamiento con fármacos y similares, sino también la fuerza y la debilidad y similares de los efectos secundarios. Las enfermedades mencionadas antes no se limitan a las siguientes, y sus ejemplos incluyen cáncer, síndrome mielodisplásico, infecciones por VIH-1, trombosis, embolia, rechazo en trasplantes, trastorno por déficit de atención/hiperactividad y similares, preferiblemente cáncer.

Los ejemplos del gen, cuya mutación se sabe que está relacionada con el inicio del cáncer y/o la sensibilidad al tratamiento, incluyen los siguientes (el tipo de cáncer se indica conjuntamente), y estos genes son ejemplos de dianas preferibles:

- 20 gen de fusión ABL/BCR (leucemia mieloide crónica), gen HER2 (cáncer de mama), gen EGFR (cáncer de pulmón no microcítico), gen c-KIT (tumor del estroma gastrointestinal), gen KRAS (cáncer colorrectal, cáncer pancreático), gen BRAF (melanoma, cáncer colorrectal), gen PI3KCA (cáncer de pulmón, cáncer colorrectal), gen FLT3 (leucemia mieloide aguda), gen MYC (varios carcinomas), gen MYCN (neuroblastoma), gen MET (cáncer de pulmón, cáncer gástrico, melanoma), gen BCL2 (linfoma B folicular), gen de fusión EML4/ALK (cáncer de pulmón).

- 25 De los genes mencionados antes, son dianas particularmente preferidas los genes KRAS, EGFR y BRAF, puesto que hay muchos pacientes que son las dianas de detección de mutaciones, y su relación causal con el cáncer es comparativamente bien conocida.

- La "diferencia en una secuencia de bases" que es una diana de detección en el método de la presente invención es cualquier diferencia respecto a la secuencia de bases estándar (es decir, la secuencia de bases del ácido nucleico no diana de detección). La diferencia en una secuencia de bases puede ser causada, por ejemplo, por una o más mutaciones por sustitución, inserción, eliminación, inversión, superposición y translocación y similares, o una de sus combinaciones. Preferiblemente, la diferencia en una secuencia de bases es una mutación de un gen que se sabe que está relacionada con el inicio y/o sensibilidad al tratamiento de una enfermedad particular. Para ser específicos, por ejemplo, se sabe que una mutación del 12º codón o 13º codón del segundo exón del gen KRAS está relacionada con la eficacia de la respuesta de un fármaco de diana molecular cetuximab, y la mutación incluye, por ejemplo, lo siguiente (la secuencia de bases del segundo exón del gen KRAS (el segundo exón corresponde a las posiciones 7 a 128 de la secuencia de bases mostrada en la SEQ ID NO: 1) se muestra en la figura 1. La SEQ ID NO: 2 muestra la secuencia de aminoácidos codificada por el segundo exón).

mutación del 12º codón:

- 40 GGT (G) → TGT (C), GTT (V), AGT (S)
GAT (D), CGT (R), GCT (A)

mutación del 13º codón:

GGC (G) → GAC (D)

- 45 En el gen EGFR, se producen mutaciones plurales en el 18º exón al 21º exón, que se sabe que se correlacionan con la eficacia de la respuesta del fármaco diana molecular gefitinib (véase, por ejemplo, el documento JP-A-2006-288353). Como tal mutación, por ejemplo, se puede mencionar lo siguiente.

mutación del 18º exón:

G719C, G719S, G719A

mutación del 19º de exón:

- 50 E746-A750del (nt 2235-2249del),
E746-A750del (nt 2236-2250del),
L747-A750del T751S,

L747-S752del P753S,
 L747-E749del A750P,
 L747-S752del E746V,
 S752-I759del

5 mutación del 20º exón:
 T790M, S768I
 mutación del 21º exón:
 L858R, L861Q

10 En el gen BRAF, se sabe que la mutación del codón 600 del 15º exón se correlaciona con la eficacia de la respuesta de los fármacos dianas moleculares cetuximab y panitumumab. Como tal mutación, por ejemplo, se pueden mencionar las siguientes.

mutación del codón 600:
 GTG (V) → GAG (E)

Se explica cada etapa a continuación.

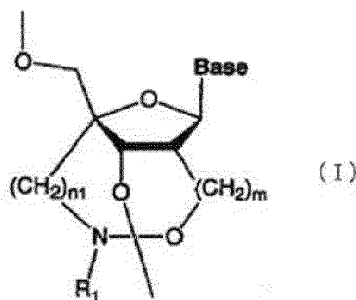
15 (1) una etapa de amplificación selectiva de una región que contiene al menos una parte del sitio diana de detección del ácido nucleico diana de detección en la muestra de ensayo por un método de amplificación de ácido nucleico usando un ácido nucleico abrazadera que tiene una secuencia de bases complementaria a la secuencia de bases del sitio diana de detección de un ácido nucleico no diana de detección

20 En la presente memoria descriptiva, el "sitio diana de detección" se refiere a una región en el ácido nucleico diana que es la diana de detección de una diferencia en una secuencia de bases. Por ejemplo, cuando la diferencia que se va a detectar es una diferencia en una base única (por ejemplo, mutación de una única base), el sitio diana de detección puede ser la región de la base única o los alrededores de la región de la base única.

25 En la presente memoria descriptiva, el "ácido nucleico diana de detección" es un ácido nucleico que tiene una diferencia en una secuencia de bases del sitio diana de detección en el ácido nucleico diana, y en general significa un ácido nucleico que tiene una secuencia de bases diferente de un gen de tipo natural, en donde el gen de tipo natural es el estándar. Una secuencia de bases particular se puede seleccionar de acuerdo con el objeto de ensayo, y el ácido nucleico diana de detección puede ser un ácido nucleico que tiene la secuencia de bases particular.

30 En la presente memoria descriptiva, el "ácido nucleico no diana de detección" es un ácido nucleico que carece de una diferencia en una secuencia de bases del sitio de destino de detección en el ácido nucleico diana, y en general significa un ácido nucleico que tiene la misma secuencia de bases que en el gen de tipo natural. Una secuencia de bases que es el estándar se puede seleccionar de acuerdo con el objeto de ensayo, y el ácido nucleico no diana de detección puede ser un ácido nucleico que tiene la secuencia de bases estándar.

35 En la presente memoria descriptiva, el "ácido nucleico abrazadera" es un ácido nucleico que puede hibridar con el sitio diana de detección de un ácido nucleico no diana de detección. Por lo tanto, el ácido nucleico abrazadera tiene una secuencia de bases complementaria de la secuencia de bases de un sitio diana de detección en un ácido nucleico no diana de detección. En el método de la presente invención, un análogo de oligonucleótido que contiene uno o más tipos de una o más estructuras unitarias de un análogo de nucleósido representado por la siguiente fórmula (I):



40 en donde

Base es una base de ácido nucleico pirimidínica o púrica que tiene opcionalmente uno o más sustituyentes,

R₁ es un átomo de hidrógeno, un grupo alquilo, un grupo alqueno, un grupo cicloalquilo, un grupo arilo, un grupo aralquilo, un grupo acilo, un grupo sulfonilo, un grupo sililo, o un sustituyente de unidad de molécula funcional,

m es un número entero de 0 - 2, y

n₁ es un número entero de 1 - 3,

5 (con la condición de que una forma de unión entre los respectivos análogos de nucleósidos en los análogos de oligonucleótidos contenga opcionalmente uno o más enlaces fosforotioato además de un enlace fosfodiéster y, cuando estén contenidos dos o más de uno o más de tipos de estructuras unitarias mencionadas antes la Base puede ser la misma o diferente entre las estructuras) o una de sus sales, se usa como el ácido nucleico abrazadera. En el contexto de la explicación de la presente invención, dicho análogo de oligonucleótido o una de sus sales se
10 denomina "BNA después de la segunda generación" o simplemente "BNA".

En la fórmula (I), el ácido nucleico de bases pirimidínicas o púricas incluye bases que en general se conocen como elementos constituyentes de los ácidos nucleicos (por ejemplo, guanina, adenina, citosina, timina, uracilo) y todas las demás estructuras químicas que son similares a estos y que pueden actuar como, o pueden usarse en lugar de las bases que constituyen los ácidos nucleicos. Los ejemplos preferidos son bases de ácido nucleico pirimidínicas o púricas, y bases de ácido nucleico pirimidínicas o púricas que tienen opcionalmente uno o más sustituyentes seleccionados del grupo α que se describirá más adelante. En concreto, se prefiere un grupo purin-9-ilo, un grupo 2-oxopirimidin-1-ilo o un grupo purin-9-ilo o un grupo 2-oxopirimidin-1-ilo que tiene un sustituyente seleccionado del siguiente grupo α .
15

Grupo α : un grupo hidroxilo, un grupo hidroxilo protegido con un grupo protector para la síntesis de ácidos nucleicos, un grupo alcoxi que tiene de 1 a 5 átomos de carbono, un grupo mercapto, un grupo mercapto protegido con un grupo protector para la síntesis de ácidos nucleicos, un grupo alquiltio que tiene de 1 a 5 átomos de carbono, un grupo amino, un grupo amino protegido con un grupo protector para la síntesis de ácidos nucleicos, un grupo amino sustituido con un grupo alquilo que tiene de 1 a 5 átomos de carbono, un grupo alquilo que tiene de 1 a 5 átomos de carbono, y un átomo de halógeno.
20

Un grupo preferido como la "base de ácido nucleico púrica que tiene opcionalmente el sustituyente" es un grupo 6-aminopurin-9-ilo (es decir adeninilo), un grupo 6-aminopurin-9-ilo que tiene el grupo amino protegido con un grupo protector para la síntesis de ácidos nucleicos, un grupo 2,6-diaminopurin-9-ilo, un grupo 2-amino-6-cloropurin-9-ilo, un grupo 2-amino-6-cloropurin-9-ilo que tiene el grupo amino protegido con un grupo protector para la síntesis de ácidos nucleicos, un grupo 2-amino-6-fluoropurin-9-ilo, un grupo 2-amino-6-fluoropurin-9-ilo que tiene el grupo amino protegido con un grupo protector para la síntesis de ácidos nucleicos, un grupo 2-amino-6-bromopurin-9-ilo, un grupo 2-amino-6-bromopurin-9-ilo que tiene el grupo amino protegido con un grupo protector para la síntesis de ácidos nucleicos, un grupo 2-amino-6-hidroxipurin-9-ilo (es decir, guaninilo), un grupo 2-amino-6-hidroxipurin-9-ilo que tiene el grupo amino protegido con un grupo protector para la síntesis de ácidos nucleicos, un grupo 6-amino-2-metoxipurin-9-ilo, un grupo 6-amino-2-cloropurin-9-ilo, un grupo 6-amino-2-fluoropurin-9-ilo, un grupo 2,6-dimetoxipurin-9-ilo, un grupo 2,6-dicloropurin-2-ilo o un grupo 6-mercaptopurin-9-ilo. Es más preferido un grupo 6-benzoilaminopurin-9-ilo, un grupo adeninilo, un grupo 2-isobutirilamino-6-hidroxipurin-9-ilo o un grupo guaninilo.
25
30
35

Un grupo preferido como la "base de ácido nucleico pirimidínica que tiene opcionalmente el sustituyente" es un grupo 2-oxo-4-amino-1,2-dihidropirimidin-1-ilo (es decir, citosinilo), un grupo 2-oxo-4-amino-1,2-dihidropirimidin-1-ilo que tiene el grupo amino protegido con un grupo protector para la síntesis de ácidos nucleicos, un grupo 2-oxo-4-amino-5-fluoro-1,2-dihidropirimidin-1-ilo, un grupo 2-oxo-4-amino-5-fluoro-1,2-dihidropirimidin-1-ilo que tiene el grupo amino protegido con un grupo protector para la síntesis de ácidos nucleicos, un grupo 4-amino-2-oxo-5-cloro-1,2-dihidropirimidin-1-ilo, un grupo 2-oxo-4-metoxi-1,2-dihidropirimidin-1-ilo, un grupo 2-oxo-4-mercapto-1,2-dihidropirimidin-1-ilo, un grupo 2-oxo-4-hidroxi-1,2-dihidropirimidin-1-ilo (es decir, uracilo), un grupo 2-oxo-4-hidroxi-5-metil-1,2-dihidropirimidin-1-ilo (es decir, timinilo) o un grupo 4-amino-5-metil-2-oxo-1,2-dihidropirimidin-1-ilo (es decir, 5-metilcitosinilo). Es más preferido un grupo 2-oxo-4-benzoilamino-1,2-dihidropirimidin-1-ilo, un grupo citosinilo, un grupo timinilo, un grupo uracilo, un grupo 2-oxo-4-benzoilamino-5-metil-1,2-dihidropirimidin-1-ilo o un grupo 5-metilcitosinilo.
40
45

Es más preferido entre las "bases de ácido nucleico púricas o pirimidínicas que tienen opcionalmente un sustituyente" el 6-aminopurin-9-ilo (es decir adeninilo), 6-aminopurin-9-ilo que tiene el grupo amino protegido con un grupo protector para la síntesis de ácidos nucleicos, grupo 2,6-diaminopurin-9-ilo, 2-amino-6-cloropurin-9-ilo, 2-amino-6-cloropurin-9-ilo que tiene el grupo amino protegido con un grupo protector para la síntesis de ácidos nucleicos, 2-amino-6-fluoropurin-9-ilo, 2-amino-6-fluoropurin-9-ilo que tiene el grupo amino protegido con un grupo protector para la síntesis de ácidos nucleicos, 2-amino-6-bromopurin-9-ilo, 2-amino-6-bromopurin-9-ilo que tiene el grupo amino protegido con un grupo protector para la síntesis de ácidos nucleicos, 2-amino-6-hidroxipurin-9-ilo (es decir, guaninilo), 2-amino-6-hidroxipurin-9-ilo que tiene el grupo amino protegido con un grupo protector para la síntesis de ácidos nucleicos, 6-amino-2-metoxipurin-9-ilo, 6-amino-2-cloropurin-9-ilo, 6-amino-2-fluoropurin-9-ilo, 2,6-dimetoxipurin-9-ilo, 2,6-dicloropurin-2-ilo, 6-mercaptopurin-9-ilo, 2-oxo-4-amino-1,2-dihidropirimidin-1-ilo (es decir, citosinilo), 2-oxo-4-amino-1,2-dihidropirimidin-1-ilo que tiene el grupo amino protegido con un grupo protector para la síntesis de ácidos nucleicos, 2-oxo-4-amino-5-fluoro-1,2-dihidropirimidin-1-ilo, 2-oxo-4-amino-5-fluoro-1,2-
50
55

dihidropirimidin-1-ilo que tiene el grupo amino protegido con un grupo protector para la síntesis de ácidos nucleicos, 4-amino-2-oxo-5-cloro-1,2-dihidropirimidin-1-ilo, 2-oxo-4-metoxi-1,2-dihidropirimidin-1-ilo, 2-oxo-4-mercapto-1,2-dihidropirimidin-1-ilo, 2-oxo-4-hidroxi-1,2-dihidropirimidin-1-ilo (es decir, uracino), 2-oxo-4-hidroxi-5-metil-1,2-dihidropirimidin-1-ilo (es decir, timinilo), 4-amino-5-metil-2-oxo-1,2-dihidropirimidin-1-ilo (es decir, 5-metilcitosinilo) o 4-amino-5-metil-2-oxo-1,2-dihidropirimidin-1-ilo que tiene el grupo amino protegido con un grupo protector para la síntesis de ácidos nucleicos.

El "grupo protector para un grupo hidroxilo para la síntesis de ácidos nucleicos" como R₂ y R₃, y el "grupo protector en el "grupo hidroxilo protegido con un grupo protector para la síntesis de ácidos nucleicos" como R₄ y R₅ y en el grupo α, no están limitados, siempre que puedan proteger al grupo hidroxilo de forma estable durante la síntesis de ácidos nucleicos. En concreto, se refieren a grupos protectores que son estables en condiciones ácidas o neutras y que se pueden escindir con un método químico tal como hidrogenolisis, hidrólisis, electrolisis o fotólisis. Los ejemplos de dichos grupos protectores son "grupo acilo alifáticos" por ejemplo, grupos alquilcarbonilo tales como formilo, acetilo, propionilo, butirilo, isobutirilo, pentanoilo, pivaloilo, valerilo, isovalerilo, octanoilo, nonanoilo, decanoilo, 3-metilnonanoilo, 8-metilnonanoilo, 3-etiloctanoilo, 3,7-dimetiloctanoilo, undecanoilo, dodecanoilo, tridecanoilo, tetradecanoilo, pentadecanoilo, hexadecanoilo, 1-metilpentadecanoilo, 14-metilpentadecanoilo, 13,13-dimetiltetradecanoilo, heptadecanoilo, 15-metilhexadecanoilo, octadecanoilo, 1-metilheptadecanoilo, nonadecanoilo, eicosanoilo, y heneicosanoilo, grupos alquilcarbonilo carboxilados tales como succinoilo, glutarilo y adipilo, grupos halogeno-alkil inferior-carbonilo tales como cloroacetilo, dicloroacetilo, tricloroacetilo y trifluoroacetilo, grupos alcoxi inferior-alkil inferior-carbonilo tales como metoxiacetilo, y grupos alquilcarbonilo insaturados tales como (E)-2-metil-2-butenilo; "grupos alquilo inferior" tales como metilo, etilo, n-propilo, isopropilo, n-butilo, isobutilo, s-butilo, terc-butilo, n-pentilo, isopentilo, 2-metilbutilo, neopentilo, 1-etilpropilo, n-hexilo, isohexilo, 4-metilpentilo, 3-metilpentilo, 2-metilpentilo, 1-metilpentilo, 3,3,-dimetilbutilo, 2,2-dimetilbutilo, 1,1-dimetilbutilo, 1,2-dimetilbutilo, 1,3-dimetilbutilo, 2,3-dimetilbutilo y 2-etilbutilo; "grupos alqueno inferior" tales etenilo, 1-propenilo, 2-propenilo, 1-metil-2-propenilo, 1-metil-1-propenilo, 2-metil-1-propenilo, 2-metil-2-propenilo, 2-etil-2-propenilo, 1-butenilo, 2-butenilo, 1-metil-2-butenilo, 1-metil-1-butenilo, 3-metil-2-butenilo, 1-etil-2-butenilo, 3-butenilo, 1-metil-3-butenilo, 2-metil-3-butenilo, 1-etil-3-butenilo, 1-pentenilo, 2-pentenilo, 1-metil-2-pentenilo, 2-metil-2-pentenilo, 3-pentenilo, 1-metil-3-pentenilo, 2-metil-3-pentenilo, 4-pentenilo, 1-metil-4-pentenilo, 2-metil-4-pentenilo, 1-hexenilo, 2-hexenilo, 3-hexenilo, 4-hexenilo y 5-hexenilo; "grupos acilo aromáticos", por ejemplo, grupos arilcarbonilo tales como benzoilo, α-naftoilo y β-naftoilo, grupos halogenoarilcarbonilo tales como 2-bromobenzoilo y 4-clorobenzoilo, grupos arilcarbonilo alquilados inferiores tales como 2,4,6-trimetilbenzoilo y 4-toluilo, grupos arilcarbonilo alcoxilados inferiores tales como 4-anisoilo, grupos arilcarbonilo carboxilados tales como 2-carboxibenzoilo, 3-carboxibenzoilo y 4-carboxibenzoilo, grupos arilcarbonilo nitrados tales como 4-nitrobenzoilo y 2-nitrobenzoilo, grupos arilcarbonilo alcoxi inferior-carbonilados tales como 2-(metoxicarbonil)benzoilo, y grupos arilcarbonilo arilados tales como 4-fenilbenzoilo; "grupos tetrahidropirano o tetrahidrotiopirano" tales como tetrahidropiran-2-ilo, 3-bromotetrahidropiran-2-ilo, 4-metoxitetrahidropiran-4-ilo, tetrahidrotiopiran-4-ilo y 4-metoxitetrahidrotiopiran-4-ilo; "grupos tetrahidrofuranilo o tetrahidrotiofuranilo" tales como tetrahidrofuran-2-ilo y tetrahidrotiofuran-2-ilo; "grupos sililo", por ejemplo, grupos tri-alkil inferior-sililo tales como trimetilsililo, trietilsililo, isopropildimetilsililo, t-butildimetilsililo, metildiisopropilsililo, metildi-t-butilsililo y triisopropilsililo, grupos alquil inferior-sililo sustituidos con uno o dos grupos arilo, tales como difenilmetsililo, difenilbutilsililo, difenilisopropilsililo y fenildiisopropilsililo; "grupos alcoxi inferior-metilo" tales como metoximetilo, 1,1-dimetil-1-metoximetilo, etoximetilo, propoximetilo, isopropoximetilo, butoximetilo y terc-butoximetilo; "grupos alcoxi inferior-metilo alcoxilados inferiores" tales como 2-metoxietoximetilo; "grupos halogeno-alcoxi inferior-metilo" tales como 2,2,2-tricloroetoximetilo y bis(2-cloroetoxi)metilo; "grupos etilo alcoxilados inferiores" tales como 1-etoxietilo y 1-(isopropoxi)etilo; "grupos etilo halogenados" tales como 2,2,2-tricloroetilo; "grupos metilo sustituidos con uno a tres grupos arilo" tales como bencilo, α-naftilmetilo, β-naftilmetilo, difenilmetilo, trifenilmetilo, α-naftildifenilmetilo y 9-antrilmetilo; "grupos metilo sustituidos con uno a tres grupos arilo que tienen un anillo de arilo sustituido con un grupo alquilo inferior, alcoxi inferior, halógeno o ciano", tales como 4-metilbencilo, 2,4,6-trimetilbencilo, 3,4,5-trimetilbencilo, 4-metoxibencilo, 4-metoxifenildifenilmetilo, 4,4'-dimetoxitriphenilmetilo, 2-nitrobencilo, 4-nitrobencilo, 4-clorobencilo, 4-bromobencilo y 4-cianobencilo; "grupos alcoxi inferior-carbonilo" tales como metoxicarbonilo, etoxicarbonilo, t-butoxicarbonilo e isobutoxicarbonilo; "grupos arilo sustituidos con un átomo de halógeno, un grupo alcoxi inferior o un grupo nitro", tales como 4-clorofenilo, 2-fluorofenilo, 4-metoxifenilo, 4-nitrofenilo y 2,4-dinitrofenilo; "grupos alcoxi inferior-carbonilo sustituidos con halógeno o un grupo alquil inferior-sililo", tales como 2,2,2-tricloroetoxicarbonilo y 2-trimetilsililetoxicarbonilo; "grupos alqueniloxicarbonilo" tales como viniloxicarbonilo y ariloxicarbonilo; y "grupos aralquiloxicarbonilo que tienen un anillo de arilo opcionalmente sustituido con uno o dos grupos alcoxi inferior o nitro", tales como benciloxicarbonilo, 4-metoxibenciloxicarbonilo, 3,4-dimetoxibenciloxicarbonilo, 2-nitrobenciloxicarbonilo y 4-nitrobenciloxicarbonilo.

El "grupo protector para un grupo hidroxilo para la síntesis de ácidos nucleicos", tales como R₂ y R₃, preferiblemente es el "grupo acilo alifático", el "grupo acilo aromático", el "grupo metilo sustituido con uno a tres grupos arilo", el "grupo metilo sustituido con uno a tres grupos arilo que tienen un anillo de arilo sustituido con un grupo alquilo inferior, alcoxi inferior, halógeno o ciano", o el "grupo sililo", más preferiblemente un grupo acetilo, un grupo benzoilo, un grupo bencilo, un grupo p-metoxibenzoilo, un grupo dimetoxitritilo, un grupo monometoxitritilo, o un grupo terc-butildifenilsililo. El grupo protector en el "grupo hidroxilo protegido con un grupo protector para la síntesis de ácidos nucleicos", como R₄ y R₅ y en el grupo α, preferiblemente es el "grupo acilo alifático", el "grupo acilo aromático", el "grupo metilo sustituido con de uno a tres grupos arilo", el "grupo arilo sustituido con un átomo de halógeno, un grupo alcoxi inferior o un grupo nitro", el "grupo alquilo inferior", o el "grupo alqueno inferior", más preferiblemente

un grupo benzoilo, un grupo bencilo, un grupo 2-clorofenilo, un grupo 4-clorofenilo o un grupo 2-propenilo.

El "grupo alquilo", como R_1 , R_2 y R_3 , se refiere a un grupo alquilo de cadena lineal o cadena ramificada que tiene de 1 a 20 átomos de carbono, e incluye un grupo alquilo de cadena lineal o cadena ramificada que tiene de 1 a 6 átomos de carbono (dicho grupo alquilo se puede denominar en la presente memoria un grupo alquilo inferior), tal como metilo, etilo, n-propilo, isopropilo, n-butilo, isobutilo, s-butilo, terc-butilo, n-pentilo, isopentilo, 2-metilbutilo, neopentilo, 1-etilpropilo, n-hexilo, isohexilo, 4-metilpentilo, 3-metilpentilo, 2-metilpentilo, 1-metilpentilo, 3,3,-dimetilbutilo, 2,2-dimetilbutilo, 1,1-dimetilbutilo, 1,2-dimetilbutilo, 1,3-dimetilbutilo, 2,3-dimetilbutilo o 2-etilbutilo. El grupo alquilo también incluye un grupo alquilo de cadena lineal o cadena ramificada que tiene de 7 a 20 átomos de carbono, tal como heptilo, octilo, nonilo o decilo. Se prefiere el grupo alquilo de cadena lineal o cadena ramificada mencionado antes que tiene de 1 a 6 átomos de carbono.

Los ejemplos del "grupo alqueno que tiene 1 - 4 átomos de carbono" para A incluyen los grupos metileno, etileno, trimetileno y tetrametileno. Se prefiere un grupo metileno.

El "grupo alqueno", como R_1 , R_2 y R_3 , se refiere a un grupo alqueno de cadena lineal o cadena ramificada que tiene de 2 a 20 átomos de carbono, e incluye un grupo alqueno de cadena lineal o ramificada que tiene de 2 a 6 átomos de carbono (dicho grupo alqueno se puede denominar en la presente memoria un grupo alqueno inferior), tales como etenilo, 1-propenilo, 2-propenilo, 1-metil-2-propenilo, 1-metil-1-propenilo, 2-metil-1-propenilo, 2-metil-2-propenilo, 2-etil-2-propenilo, 1-butenilo, 2-butenilo, 1-metil-2-butenilo, 1-metil-1-butenilo, 3-metil-2-butenilo, 1-etil-2-butenilo, 3-butenilo, 1-metil-3-butenilo, 2-metil-3-butenilo, 1-etil-3-butenilo, 1-pentenilo, 2-pentenilo, 1-metil-2-pentenilo, 2-metil-2-pentenilo, 3-pentenilo, 1-metil-3-pentenilo, 2-metil-3-pentenilo, 4-pentenilo, 1-metil-4-pentenilo, 2-metil-4-pentenilo, 1-hexenilo, 2-hexenilo, 3-hexenilo, 4-hexenilo y 5-hexenilo. El grupo alqueno también incluye geranilo y farnesilo, y se prefiere el grupo alqueno de cadena lineal o cadena ramificada mencionado antes que tiene de 2 a 6 átomos de carbono.

El "grupo cicloalquilo", como R_1 , R_2 y R_3 , se refiere a un grupo cicloalquilo que tiene de 3 a 10 átomos de carbono, e incluye, por ejemplo, ciclopropilo, ciclobutilo, ciclopentilo, ciclohexilo, cicloheptilo, ciclooctilo, norbornilo y adamantilo. Se prefiere un grupo cicloalquilo que tiene de 3 a 8 átomos de carbono, tal como ciclopropilo, ciclobutilo, ciclopentilo, ciclohexilo, cicloheptilo o ciclooctilo. El "grupo cicloalquilo" también incluye un grupo heterocíclico en el que uno o más grupos metileno en el anillo del grupo cicloalquilo se han sustituido por átomos de oxígeno o átomos de azufre, o átomos de nitrógeno sustituidos con un grupo alquilo. Un ejemplo del grupo heterocíclico es un grupo tetrahidropirano.

El "grupo arilo", como R_1 , R_2 y R_3 , se refiere a un sustituyente monovalente que tiene de 6 a 14 átomos de carbono que permanece después de eliminar un átomo de hidrógeno de un grupo hidrocarburo aromático, e incluye, por ejemplo, fenilo, indenilo, naftilo, fenantrenilo y antraceno. El grupo arilo puede estar sustituido con uno o más grupos, tales como un átomo de halógeno, un grupo alquilo inferior, un grupo hidroxilo, un grupo alcoxi, un grupo ariloxi, un grupo amino, un grupo nitro, trifluorometilo y un grupo fenilo. Ejemplos del grupo arilo opcionalmente sustituido son 2-metilfenilo, 2,6-dimetilfenilo, 2-clorofenilo, 4-clorofenilo, 2,4-diclorofenilo, 2,5-diclorofenilo, 2-bromofenilo, 4-metoxifenilo, 4-cloro 2-nitrofenilo, 4-nitrofenilo, 2,4-dinitrofenilo y bifenilo. Los ejemplos preferidos son un grupo fenilo y un grupo fenilo sustituido con un átomo de halógeno, un grupo alcoxi inferior o un grupo nitro.

El "grupo aralquilo", como R_1 , R_2 y R_3 , se refiere a un grupo alquilo que tiene de 1 a 6 átomos de carbono que se han sustituido con un grupo arilo. Los ejemplos del grupo aralquilo son "grupos metilo sustituidos con uno a tres grupos arilo", tales como bencilo, α -naftilmetilo, β -naftilmetilo, indenilmetilo, fenantrenilmetilo, antracencilmetilo, difenilmetilo, trifenilmetilo, α -naftildifenilmetilo y 9-antilmetilo, y "grupos metilo sustituidos con uno a tres grupos arilo que tienen un anillo arilo sustituido con un grupo alquilo inferior, alcoxi inferior, halógeno o ciano", tales como 4-metilbencilo, 2,4,6-trimetilbencilo, 3,4,5-trimetilbencilo, 4-metoxibencilo, 4-metoxifenildifenilmetilo, 4,4'-dimetoxitriphenilmetilo, 2-nitrobencilo, 4-nitrobencilo, 4-clorobencilo, 4-bromobencilo y 4-cianobencilo. Otros ejemplos incluyen "grupos alquilo que tienen de 3 a 6 átomos de carbono sustituidos con un grupo arilo", tales como 1-fenetilo, 2-fenetilo, 1-naftiletilo, 2-naftiletilo, 1-fenilpropilo, 2-fenilpropilo, 3-fenilpropilo, 1-naftilpropilo, 2-naftilpropilo, 3-naftilpropilo, 1-fenilbutilo, 2-fenilbutilo, 3-fenilbutilo, 4-fenilbutilo, 1-naftilbutilo, 2-naftilbutilo, 3-naftilbutilo, 4-naftilbutilo, 1-fenilpentilo, 2-fenilpentilo, 3-fenilpentilo, 4-fenilpentilo, 5-fenilpentilo, 1-naftilpentilo, 2-naftilpentilo, 3-naftilpentilo, 4-naftilpentilo, 5-naftilpentilo, 1-fenilhexilo, 2-fenilhexilo, 3-fenilhexilo, 4-fenilhexilo, 5-fenilhexilo, 6-fenilhexilo, 1-naftilpentilo, 2-naftilpentilo, 3-naftilpentilo, 4-naftilpentilo, 5-naftilpentilo y 6-naftilpentilo. Los ejemplos preferidos son los "grupos metilo sustituidos con uno a tres grupos arilo", y los "grupos metilo sustituidos con uno a tres grupos arilo que tienen un anillo de arilo sustituido con un grupo alquilo inferior, alcoxi inferior, halógeno o ciano". Ejemplos más preferidos son 4-metoxifenildifenilmetilo y 4,4'-dimetoxitriphenilmetilo.

Los ejemplos del "grupo acrílico", como R_1 , R_2 y R_3 , son "grupos acrílicos alifáticos", por ejemplo, grupos alquilcarbonilo tales como formilo, acetilo, propionilo, butirilo, isobutirilo, pentanoilo, pivaloilo, valerilo, isovalerilo, octanoilo, nonanoilo, decanoilo, 3-metilnonanoilo, 8-metilnonanoilo, 3-etiloctanoilo, 3,7-dimetiloctanoilo, undecanoilo, dodecanoilo, tridecanoilo, tetradecanoilo, pentadecanoilo, hexadecanoilo, 1-metilpentadecanoilo, 14-metilpentadecanoilo, 13,13-dimetiltetradecanoilo, heptadecanoilo, 15-metilhexadecanoilo, octadecanoilo, 1-metilheptadecanoilo, nonadecanoilo, eicosanoilo y heneicosanoilo, grupos alquilcarbonilo carboxilados tales como succinoilo, glutarilo y adipoilo, grupos halógeno-alquil inferior-carbonilo tales como cloroacetilo, dicloroacetilo,

tricloraacetilo y trifluoroacetilo, grupos alcoxi inferior-alquil inferior-carbonilo tales como metoxiacetilo, grupos ariloxi-alquil inferior-carbonilo tales como un grupo fenoxiacetilo, y grupos alquilcarbonilo insaturados tales como (E)-2-metil-2-butenilo; y "grupos acilo aromáticos", por ejemplo, grupos arilcarbonilo tales como grupos benzoilo, α -naftoilo y β -naftoilo, grupos halogenoarilcarbonilo tales como 2-bromobenzoilo y 4-clorobenzoilo, grupos arilcarbonilo alquilados inferiores tales como 2,4,6-trimetilbenzoilo y 4-toluilo, grupos arilcarbonilo alcoxilados inferiores tales como 4-anisoilo, grupos arilcarbonilo carboxilados tales como 2-carboxibenzoilo, 3-carboxibenzoilo y 4-carboxibenzoilo, grupos arilcarbonilo nitrados tales como 4-nitrobenzoilo y 2-nitrobenzoilo, grupos arilcarbonilo alcoxi inferior-carbonilados tales como 2-(metoxycarbonil)benzoilo, y grupos arilcarbonilo arilados tales como 4-fenilbenzoilo. Los ejemplos preferidos son grupos formilo, acetilo, propionilo, butirilo, isobutirilo, pentanoilo, pivaloilo, benzoilo y fenoxiacetilo.

Como el "grupo sulfonilo", como R_1 , se pueden denominar "grupos sulfonilo alifáticos", por ejemplo, grupos sulfonilo sustituidos con un grupo alquilo de cadena lineal o cadena ramificada que tiene de 1 a 6 átomos de carbono, tales como metanosulfonilo y etanosulfonilo, y "grupos sulfonilo aromáticos", por ejemplo, grupos sulfonilo sustituidos con varios grupos arilo, tales como bencenosulfonilo y p-toluenosulfonilo. Los ejemplos preferidos son metanosulfonilo y p-toluenosulfonilo.

Como el "grupo sililo", como R_1 , R_2 y R_3 , se pueden mencionar "grupos tri-alquil inferior-sililo" tales como trimetilsililo, trietilsililo, isopropildimetilsililo, terc-butildimetilsililo, metildiisopropilsililo, metildi-terc-butilsililo y triisopropilsililo, "grupos alquilsililo inferior sustituidos con uno o dos grupos arilo", tales como difenilmetsililo, butildifenilbutilsililo, difenilisopropilsililo y fenildiisopropilsililo. Son ejemplos preferidos trimetilsililo, trietilsililo, triisopropilsililo, t-butildimetilsililo, t-butildifenilsililo. Un ejemplo más preferido es trimetilsililo.

El "grupo protector" en el "grupo fosfato protegido con un grupo protector para la síntesis de ácidos nucleicos" como R_2 y R_3 , no está limitado, siempre que pueda proteger el grupo fosfato establemente durante la síntesis de ácidos nucleicos. En concreto, se refiere a un grupo protector que es estable en condiciones ácidas o neutras, y que se puede escindir por un método químico tal como hidrogenolisis, hidrólisis, electrolisis o fotolisis. Los ejemplos de dicho grupo protector son "grupos alquilo inferiores" tales como metilo, etilo, n-propilo, isopropilo, n-butilo, isobutilo, s-butilo, terc-butilo, n-pentilo, isopentilo, 2-metilbutilo, neopentilo, 1-etilpropilo, n-hexilo, isohexilo, 4-metilpentilo, 3-metilpentilo, 2-metilpentilo, 1-metilpentilo, 3,3,-dimetilbutilo, 2,2-dimetilbutilo, 1,1-dimetilbutilo, 1,2-dimetilbutilo, 1,3-dimetilbutilo, 2,3-dimetilbutilo y 2-etilbutilo; "grupos alquilo inferior con ciano" tales como 2-cianoetilo y 2-ciano-1,1-dimetiletilo; "grupos etilo sustituidos con un grupo sililo", tal como 2-metildifenilsililetilo, 2-trimetilsililetilo y 2-trifenilsililetilo; "grupos alquilo inferior halogenados", tales como 2,2,2-tricloroetilo, 2,2,2-tribromoetilo, 2,2,2-trifluoroetilo y 2,2,2-tricloro-1,1-dietiletilo; "grupos alqueno inferior", tales como etenilo, 1-propenilo, 2-propenilo, 1-metil-2-propenilo, 1-metil-1-propenilo, 2-metil-2-propenilo, 2-etil-2-propenilo, 1-butenilo, 2-butenilo, 1-metil-2-butenilo, 1-metil-1-butenilo, 3-metil-2-butenilo, 1-etil-2-butenilo, 3-butenilo, 1-metil-3-butenilo, 2-metil-3-butenilo, 1-etil-3-butenilo, 1-pentenilo, 2-pentenilo, 1-metil-2-pentenilo, 2-metil-2-pentenilo, 3-pentenilo, 1-metil-3-pentenilo, 2-metil-3-pentenilo, 4-pentenilo, 1-metil-4-pentenilo, 2-metil-4-pentenilo, 1-hexenilo, 2-hexenilo, 3-hexenilo, 4-hexenilo y 5-hexenilo; "grupos cicloalquilo", tales como ciclopropilo, ciclobutilo, ciclopentilo, ciclohexilo, cicloheptilo, norbornilo, y adamantilo; "grupos alqueno inferior con ciano" tales como 2-cianobutenilo; "grupos aralquilo", tales como bencilo, α -naftilmetilo, β -naftilmetilo, indenilmetilo, fenantrenilmetilo, antraceniilmetilo, difenilmetilo, trifenilmetilo, 1-fenetilo, 2-fenetilo, 1-naftiletilo, 2-naftiletilo, 1-fenilpropilo, 2-fenilpropilo, 3-fenilpropilo, 1-naftilpropilo, 2-naftilpropilo, 3-naftilpropilo, 1-fenilbutilo, 2-fenilbutilo, 3-fenilbutilo, 4-fenilbutilo, 1-naftilbutilo, 2-naftilbutilo, 3-naftilbutilo, 4-naftilbutilo, 1-fenilpentilo, 2-fenilpentilo, 3-fenilpentilo, 4-fenilpentilo, 5-fenilpentilo, 1-naftilpentilo, 2-naftilpentilo, 3-naftilpentilo, 4-naftilpentilo, 5-naftilpentilo, 1-fenilhexilo, 2-fenilhexilo, 3-fenilhexilo, 4-fenilhexilo, 5-fenilhexilo, 6-fenilhexilo, 1-naftilpentilo, 2-naftilpentilo, 3-naftilpentilo, 4-naftilpentilo, 5-naftilpentilo y 6-naftilpentilo; "grupos aralquilo que tienen un anillo de arilo sustituido con un grupo nitro o un átomo de halógeno", tal como 4-clorobencilo, 2-(4-nitrofenil)etilo, o-nitrobencilo, 4-nitrobencilo, 2,4-dinitrobencilo y 4-cloro-2-nitrobencilo; "grupos arilo", tales como fenilo, indenilo, naftilo, fenantrenilo y antraceniilo; y "grupos arilo sustituidos con un grupo alquilo inferior, un átomo de halógeno o un grupo nitro", tales como 2-metilfenilo, 2,6-dimetilfenilo, 2-clorofenilo, 4-clorofenilo, 2,4-diclorofenil, 2,5-diclorofenilo, 2-bromofenilo, 4-nitrofenilo y 4-cloro-2-nitrofenilo. Los ejemplos preferidos son los "grupos alquilo inferior", "grupos alquilo inferior sustituidos con un grupo ciano", "grupos aralquilo", "grupos aralquilo que tiene un anillo de arilo sustituido con un grupo nitro o un átomo de halógeno" o "grupos arilo sustituidos con un alquilo inferior, un átomo de halógeno o un grupo nitro". Un ejemplo más preferido es un grupo 2-cianoetilo, un grupo 2,2,2-tricloroetilo, un grupo bencilo, un grupo 2-clorofenilo o un grupo 4-clorofenilo.

El "sustituyente de unidad de molécula funcional" como R_1 incluye moléculas marcadoras (por ejemplo, especies moleculares que incluyen molécula fluorescente, molécula quimioluminiscente e isótopo radiactivo).

El grupo protector en "el grupo mercapto protegido con un grupo protector para la síntesis de ácidos nucleicos" como R_4 y R_5 y en el grupo α no está limitado, siempre que pueda proteger al grupo mercapto de forma estable durante la síntesis de ácidos nucleicos. En concreto, se refiere a un grupo protector que es estable en condiciones ácidas o neutras, y que se puede escindir por un método químico tal como hidrogenolisis, hidrólisis, electrolisis o fotólisis. Ejemplos de dicho grupo protector son los mencionados antes como el grupo protector para el grupo hidroxilo, así como "grupos que forman disulfuro", por ejemplo, grupos alquiltio tales como metiltio, etiltio y terc-butiltio, y grupos ariltio tales como benciltio. Los ejemplos preferidos son "grupos acilo alifáticos" o "grupos acilo aromáticos". Ejemplos más preferidos son un grupo benzoilo y un grupo bencilo.

Ejemplos de "el grupo alcoxi que tiene de 1 a 5 átomos de carbono" como R₄ y R₅ y en el grupo α en la fórmula general (I) o (II) son metoxi, etoxi, n-propoxi, isopropoxi, n-butoxi, isobutoxi, s-butoxi, terc-butoxi y n-pentoxi. Un ejemplo preferido es un grupo metoxi o etoxi.

5 Ejemplos de "el grupo alquiltio que tiene de 1 a 5 átomos de carbono" como R₄ y R₅ y en el grupo α son metiltio, etiltio, propiltio, isopropiltio, butiltio, isobutiltio, s-butiltio, terc-butiltio y n-pentiltio. Un ejemplo preferido es un grupo metiltio o etiltio.

10 Los ejemplos de "el grupo cianoalcoxi que tiene de 1 a 6 átomos de carbono" como R₄ y R₅ son los "grupos alcoxi que tienen de 1 a 5 átomos de carbono" anteriores que se han sustituido con un grupo ciano. Dichos grupos son, por ejemplo, cianometoxi, 2-cianoetoxi, 3-cianopropoxi, 4-cianobutoxi, 3-ciano-2-metilpropoxi y 1-cianometil-1,1-dimetilmetoxi. Un ejemplo preferido es un grupo 2-cianoetoxi.

15 Ejemplos de "el grupo amino sustituido con un grupo alquilo que tiene de 1 a 5 átomos de carbono", como R₄ y R₅ y en el grupo α, son metilamino, etilamino, propilamino, isopropilamino, butilamino, isobutilamino, s-butilamino, terc-butilamino, dimetilamino, dietilamino, dipropilamino, diisopropilamino, dibutilamino, diisobutilamino, di(s-butil)amino y di(terc-butil)amino. Un ejemplo preferido es el grupo metilamino, etilamino, dimetilamino, dietilamino o diisopropilamino.

Como el "grupo alquilo que tiene de 1 a 5 átomos de carbono" en el grupo α, se pueden mencionar, por ejemplo, metilo, etilo, propilo, isopropilo, isopropilo, butilo, isobutilo, s-butilo, terc-butilo y n-pentilo. Un ejemplo preferido es un grupo metilo o etilo.

20 Como el "átomo de halógeno" en el grupo α, se pueden mencionar, por ejemplo, un átomo de flúor, un átomo de cloro, un átomo de bromo y un átomo de yodo. Un ejemplo preferido es un átomo de flúor o un átomo de cloro.

25 El grupo protector en el "grupo amino protegido con un grupo protector para la síntesis de ácidos nucleicos" en el grupo α no está limitado, siempre que pueda proteger el grupo amino de forma estable durante la síntesis de ácidos nucleicos. En concreto, se refiere a un grupo protector que es estable en condiciones ácidas o neutras, y que se puede escindir por un método químico tal como hidrogenolisis, hidrólisis, electrólisis o fotólisis. Ejemplos de dichos grupos protectores son "grupos acilo alifáticos", por ejemplo, grupos alquilcarbonilo tales como formilo, acetilo, propionilo, butirilo, isobutirilo, pentanoilo, pivaloilo, valerilo, isovalerilo, octanoilo, nonanoilo, decanoilo, 3-metilnonanoilo, 8-metilnonanoilo, 3-etiloctanoilo, 3,7-dimetiloctanoilo, undecanoilo, dodecanoilo, tridecanoilo, tetradecanoilo, pentadecanoilo, hexadecanoilo, 1-metilpentadecanoilo, 14-metilpentadecanoilo, 13,13-dimetiltetradecanoilo, heptadecanoilo, 15-metilhexadecanoilo, octadecanoilo, 1-metilheptadecanoilo, nonadecanoilo, 30 nonadecanoilo, eicosanoilo y heneicosanoilo, grupos alquilcarbonilo carboxilados tales como succinoilo, glutarilo y adipilo, grupos halógeno-alquil inferior-carbonilo tales como cloroacetilo, dicloroacetilo, tricloroacetilo y trifluoroacetilo, grupos alcoxi inferior-alquil inferior-carbonilo tales como metoxiacetilo y grupos alquilcarbonilo insaturados tales como (E)-2-metil-2-butenoilo; "grupos acilo aromáticos", por ejemplo, grupos arilcarbonilo tales como benzoilo, α-naftoilo y β-naftoilo, grupos halogenoarilcarbonilo tales como 2-bromobenzoilo y 4-clorobenzoilo, 35 grupos arilcarbonilo alquilados inferiores tales como 2,4,6-trimetilbenzoilo y 4-toluilo, grupos arilcarbonilo alcoxilados inferiores tales como 4-anisoilo, grupos arilcarbonilo carboxilados tales como 2-carboxibenzoilo, 3-carboxibenzoilo y 4-carboxibenzoilo, grupos arilcarbonilo nitrados tales como 4-nitrobenzoilo y 2-nitrobenzoilo, grupos arilcarbonilo alcoxi inferior-carbonilados tales como 2-(metoxicarbonil)benzoilo, y grupos arilcarbonilo arilados tales como 4-fenilbenzoilo; "grupos alcoxi inferior-carbonilo" tales como metoxicarbonilo, etoxicarbonilo, t-butoxicarbonilo e isobutoxicarbonilo; "grupos alcoxi inferior-carbonilo sustituidos con halógenos o un grupo alquil inferior-sililo", tales como 2,2,2-tricloroetoxicarbonilo y 2-trimetilsililetoxicarbonilo; "grupos alqueniloxicarbonilo" tales como viniloxicarbonilo y ariloxicarbonilo; y "grupos aralquiloxicarbonilo que tienen un anillo de arilo opcionalmente sustituido con uno o dos grupos alcoxi inferior o nitro", tales como benciloxicarbonilo, 4-metoxibenciloxicarbonilo, 2-nitrobenciloxicarbonilo y 4-nitrobenciloxicarbonilo. Un ejemplo preferido es el "grupo acilo alifático" o "grupo acilo 45 aromático", y un ejemplo más preferido es un grupo benzoilo.

El "análogo de nucleósido" se refiere a un tipo no natural de "nucleósido" que consiste en una base púrica o pirimidínica y un azúcar unidos entre sí, o un producto que consiste en un anillo heterocíclico aromático o un anillo de hidrocarburo aromático, que es distinto de purina y pirimidina y que se puede usar en lugar de la base púrica o pirimidínica, y un azúcar unido entre sí.

50 El "análogo de oligonucleótido" se refiere a un derivado de tipo no natural de "oligonucleótido" que comprende de 2 a 50 "nucleósidos" o "análogos de nucleósido" iguales o diferentes unidos entre sí por enlaces fosfodiéster, o posiblemente uno o más enlaces fosforotioato. Los ejemplos preferidos de dicho análogo son derivados de azúcar con la parte de azúcar modificada; derivados de tioato formados tras la formación de tioato de la parte de fosfodiéster; ésteres formados tras la esterificación de la parte de ácido fosfórico terminal; y amidas formadas tras la amidación del grupo amino en la base púrica. Ejemplos más preferidos son derivados de azúcar con la parte de 55 azúcar modificada.

"Su sal" se refiere a una sal del análogo de oligonucleótido mencionado antes, debido a que el oligonucleótido se puede convertir en la sal. Los ejemplos preferidos de la sal son sales metálicas, por ejemplo, sales de metales

alcalinos tales como sal de sodio, sal de potasio y sal de litio, sales de metales alcalinotérreos tales como sal de calcio y sal de magnesio, sal de aluminio, sal de hierro, sal de zinc, sal de cobre, sal de níquel y sal de cobalto; sales de aminas, por ejemplo, sales inorgánicas tales como sal de amonio y sales orgánicas tales como sal de t-octilamina, sal de dibencilamina, sal de morfolina, sal de glucosamina, sal de éster alquílico de fenilglicina, sal de etilendiamina, sal de N-metilglucamina, sal de guanidina, sal de dietilamina, sal de trietilamina, sal de dicitclohexilamina, sal de N, N'-dibenciletilendiamina, sal de cloroprocaína, sal de procaína, sal de dietanolamina, sal de N-bencil-fenetilamina, sal de piperazina, sal de tetrametilamonio y sal de tris(hidroximetil) aminometano; sales de ácidos inorgánicos, por ejemplo, sales de hidrácidos halogenados tales como hidrofúoruro, hidrocloreuro, hidrobromuro e hidrioduro, nitrato, perclorato, sulfato y fosfato; sales de ácidos orgánicos, por ejemplo, alcanosulfonatos inferiores tales como metanosulfonato, trifluorometanosulfonato y etanosulfonato, arilsulfonatos tales como bencenosulfonato y p-toluenosulfonato, acetato, malato, fumarato, succinato, citrato, tartrato, oxalato y maleato; y sales de aminoácidos tales como sal de glicina, sal de lisina, sal de arginina, sal de ornitina, glutamato y aspartato.

De los análogos de nucleósidos representados por la fórmula (I), se prefiere uno en el que la Base es un ácido nucleico de pirimidina o purina que tiene opcionalmente uno o más sustituyentes seleccionados del grupo α mencionado antes, y R_1 es un átomo de hidrógeno, un grupo alquilo que tiene de 1 a 5 átomos de carbono, un grupo aralquilo tal como un grupo bencilo y similares, un grupo acilo alifático inferior o aromático tal como un grupo acetilo, un grupo benzoilo y similares, o un grupo sulfonilo alifático o aromático tal como un grupo metanosulfonilo, un grupo p-toluenosulfonilo y similares. En el análogo de nucleósido, la Base se selecciona preferiblemente del siguiente grupo β y grupo γ , y más preferiblemente se selecciona del grupo γ .

grupo β : un grupo 6-aminopurin-9-ilo (es decir, adeninilo), un grupo 6-aminopurin-9-ilo que tiene el grupo amino protegido con un grupo protector para la síntesis de ácidos nucleicos, un grupo 2,6-diaminopurin-9-ilo, un grupo 2-amino-6-cloropurin-9-ilo, un grupo 2-amino-6-cloropurin-9-ilo que tiene el grupo amino protegido con un grupo protector para la síntesis de ácidos nucleicos, un grupo 2-amino-6-fluoropurin-9-ilo, un grupo 2-amino-6-fluoropurin-9-ilo que tiene el grupo amino protegido con un grupo protector para la síntesis de ácidos nucleicos, un grupo 2-amino-6-bromopurin-9-ilo, un grupo 2-amino-6-bromopurin-9-ilo que tiene el grupo amino protegido con un grupo protector para la síntesis de ácidos nucleicos, un grupo 2-amino-6-hidroxipurin-9-ilo (es decir, guaninilo), un grupo 2-amino-6-hidroxipurin-9-ilo que tiene el grupo amino protegido con un grupo protector para la síntesis de ácidos nucleicos, un grupo 6-amino-2-metoxipurin-9-ilo, un grupo 6-amino-2-cloropurin-9-ilo, un grupo 6-amino-2-fluoropurin-9-ilo, un grupo 2,6-dimetoxipurin-9-ilo, un grupo 2,6-dicloropurin-9-ilo, un grupo 6-mercaptopurin-9-ilo, un grupo 2-oxo-4-amino-1,2-dihidropirimidin-1-ilo (es decir, citosinilo), un grupo 2-oxo-4-amino-1,2-dihidropirimidin-1-ilo que tiene el grupo amino protegido con un grupo protector para la síntesis de ácidos nucleicos, un grupo 2-oxo-4-amino-5-fluoro-1,2-dihidropirimidin-1-ilo, un grupo 2-oxo-4-amino-5-fluoro-1,2-dihidropirimidin-1-ilo que tiene el grupo amino protegido con un grupo protector para la síntesis de ácidos nucleicos, un grupo 4-amino-2-oxo-5-cloro-1,2-dihidropirimidin-1-ilo, un grupo 2-oxo-4-metoxi-1,2-dihidropirimidin-1-ilo, un grupo 2-oxo-4-mercapto-1,2-dihidropirimidin-1-ilo, un grupo 2-oxo-4-hidroxi-1,2-dihidropirimidin-1-ilo (es decir, uracinilo), un grupo 2-oxo-4-hidroxi-5-metil-1,2-dihidropirimidin-1-ilo (es decir, timinilo), un grupo 4-amino-5-metil-2-oxo-1,2-dihidropirimidin-1-ilo (es decir, 5-metilcitosinilo), o 4-amino-5-metil-2-oxo-1,2-dihidropirimidin-1-ilo que tiene el grupo amino protegido con un grupo protector para la síntesis de ácidos nucleicos;

grupo γ : un grupo benzoilaminopurin-9-ilo, adenilo, 2-isobutirilamino-6-hidroxipurin-9-ilo, guaninilo, 2-oxo-4-benzoilamino-1,2-dihidropirimidin-1-ilo, citosinilo, 2-oxo-5-metil-4-benzoilamino-1,2-dihidropirimidin-1-ilo, 5-metilcitosinilo, uracinilo o timinilo.

De los análogos de nucleósidos representados por la fórmula (I), es particularmente preferido uno en el que la Base es un ácido nucleico de pirimidina o purina que tiene opcionalmente uno o más sustituyentes seleccionados del grupo α mencionado antes, R_1 es un grupo metilo, m es 0, y n_1 es 1. En los análogos de nucleósidos, la Base se selecciona preferiblemente del grupo β y el grupo γ mencionados antes, y más preferiblemente se selecciona del grupo γ .

La longitud de los análogos de oligonucleótidos del ácido nucleico abrazadera es generalmente 5 - 30 unidades monómeras, preferiblemente 5 - 25 unidades monómeras, más preferiblemente de 10 - 18 unidades monómeras. En general, cuando la longitud del ácido nucleico de la abrazadera se alarga, la capacidad de unión a una secuencia de bases de tipo natural se hace más fuerte; sin embargo, la capacidad de reconocimiento de bases (es decir, la diferencia entre la capacidad de unión a una secuencia de bases de tipo natural y la capacidad de unión a una secuencia con emparejamiento erróneo de una base) tiende a ser débil. Para lograr la detección con alta sensibilidad y precisión, es importante determinar adecuadamente la longitud del ácido nucleico de la abrazadera.

Aunque el número de análogos de nucleósidos en los análogos de oligonucleótidos no está particularmente limitado siempre que no sea menor que uno, preferiblemente se establece en el número más alto posible puesto que se puede potenciar la capacidad de unión a una secuencia de bases de tipo natural y la capacidad de reconocimiento de bases por la introducción de análogos de nucleósidos. Se prefiere en particular tener un análogo de nucleósido en el ácido nucleico abrazadera en el sitio que corresponde a la diferencia a detectar. Como el nucleósido distinto de los análogos de nucleósido en el ácido nucleico abrazadera, se usa un nucleósido natural. El nucleósido natural incluye adenosina, desoxiadenosina, guanosina, desoxiguanosina, 5-metiluridina, timidina, citidina, desoxicitidina,

uridina, desoxiuridina y similares. Cuando el ácido nucleico abrazadera es de 13 unidades monómeras, un número preferible de análogos de nucleósidos es, por ejemplo, 5 - 10, más preferiblemente 7 - 9, aunque el número no está limitado a los mismos.

5 La forma de unión entre los respectivos nucleósidos y/o análogos de nucleósidos en los análogos de oligonucleótidos puede ser un enlace fosfodiéster, y puede contener uno o más enlaces fosforotioato para impartir un efecto de resistencia a la nucleasa.

10 Los extremos se pueden modificar adecuadamente, por ejemplo, el extremo 5' del ácido nucleico abrazadera se modifica por sustitución con 2'-OMe-RNA o los análogos de nucleósidos mencionados antes, y/o el extremo 3' se monofosforila, y similares. Además, para prevenir la reacción de elongación por PCR, se pueden añadir 3 bases de emparejamiento erróneo (p. ej., GGG) en el extremo 3'.

15 La secuencia y la longitud del ácido nucleico abrazadera, y el número de análogos de nucleósidos son factores que determinan una capacidad de unión a un sitio diana de detección del ácido nucleico abrazadera, en concreto, el valor de T_m. Para lograr un efecto abrazadera suficiente en la reacción de amplificación del ácido nucleico en esta etapa, también es importante determinar adecuadamente el valor de T_m del ácido nucleico abrazadera teniendo en cuenta las propiedades de los reactivos que se van a usar para la amplificación del ácido nucleico y similares.

La abrazadera de ácido nucleico se puede sintetizar basándose en documentos tales como JP-A-2001-89496, WO 2003/068795, WO 2005/021570 y similares. Alternativamente, la síntesis del ácido nucleico abrazadera se puede encargar a una empresa encargada de la síntesis del oligonucleótido BNA.

20 En esta etapa, el ácido nucleico abrazadera mencionado antes y un ácido nucleico en una muestra de ensayo están presentes simultáneamente en una mezcla de reacción para la amplificación del ácido nucleico, y se lleva a cabo una reacción de amplificación de ácido nucleico.

25 El método de amplificación del ácido nucleico que se va a usar en esta etapa no está limitado siempre que pueda amplificar un sitio diana de detección y pueda inhibir selectivamente la amplificación mediante la unión de un ácido nucleico abrazadera. Por ejemplo, se puede usar el método de la PCR [no solo el método de la PCR basado en los principios más básicos, sino también diversas variaciones desarrolladas basadas en los mismos, tales como métodos de PCR cuantitativos tales como método de PCR de inicio en caliente, método de PCR multiplex, método de PCR anidada, método de RT-PCR, método de PCR en tiempo real, método de PCR digital y similares, método NASBA (amplificación basada en secuencia de ácido nucleico)/JP-B-2650159, método TMA (amplificación mediada por transcripción)/JP-B-3241717, método TRC (reacción concertada de transcripción Inversa-transcripción)/JP-A-30 2000-14400, método LAMP (amplificación isotérmica mediada por bucle)/WO00/28082, método ICAN (método de amplificación de ácidos nucleicos iniciada por cebador quimérico e isotérmico)/JP-B-3433929, método LCR (reacción en cadena de la ligasa)/solicitud EP N° 320328, método SDA (amplificación de desplazamiento de cadena)/JP-B-7-114718, y similares. Puesto que el método de la PCR es un método de amplificación de ácido nucleico que se usa más ampliamente, están fácilmente disponibles diferentes reactivos e instrumentos optimizados para el método, así como métodos con muchas variaciones disponibles como se ha mencionado antes, y la utilidad es extremadamente alta. Por lo tanto, se puede mencionar como un método preferible para esta etapa. Las condiciones, funcionamiento y similares de la reacción de amplificación de ácido nucleico, incluida la PCR, pueden ser las de los métodos convencionales llevadas a cabo en general en este campo.

40 La mezcla de reacción mencionada antes para la amplificación de ácido nucleico es una solución que contiene reactivos y similares necesarios para llevar a cabo la reacción de amplificación de ácido nucleico mencionada antes. Aunque la composición de la mezcla de reacción para la amplificación de ácido nucleico varía algo dependiendo del método de amplificación del ácido nucleico que se va a usar, en general, básicamente están contenidos 4 tipos de trifosfatos de desoxinucleósidos como sustratos (dATP, dTTP, dCTP, dGTP: en lo sucesivo colectivamente dNTP), ADN polimerasa como enzima, el ion magnesio como un cofactor de la enzima mencionada antes y un cebador de 45 amplificación como cebador para la elongación, en un tampón. Aunque los detalles se mencionan a continuación, se usa un método tal como el método de PCR en tiempo real y similares, capaz de llevar a cabo esta etapa y una etapa de detección del ácido nucleico amplificado en conjunto, como un método de amplificación de ácido nucleico, también están presentes simultáneamente un reactivo de detección adecuado como intercalador, sonda de marcaje de fluorescencia, sonda de ciclado y similares en la mezcla de reacción para la amplificación de ácido nucleico. En 50 cuanto a la concentración de dNTP, una concentración final óptima de cada uno de los 4 tipos debe estar dentro del intervalo de 100 a 400 µM. Se usa una ADN polimerasa que tiene propiedades adecuadas para el método de amplificación de ácido nucleico que se va a usar. Para el método de PCR, por ejemplo, se usan preferiblemente ADN polimerasas resistentes al calor como la ADN polimerasa Taq, ADN polimerasa Pfu, las desarrolladas por compañías relacionadas con biociencias y similares. En cuanto a la concentración del ion magnesio, una 55 concentración óptima debería estar en el intervalo de 1-6 mM.

El cebador de amplificación mencionado antes es un cebador usado para amplificar una región de detección por el método de amplificación de ácido nucleico mencionado antes. Un cebador de amplificación está compuesto de ácidos nucleicos como el ADN, ARN y similares, o ácidos nucleicos modificados como el LNA, BNA y similares, o una de sus combinaciones. Como concentración del cebador de amplificación, una concentración final óptima debe

estar dentro del intervalo de 20 nM a 2 μ M. El número del cebador de amplificación no está particularmente limitado siempre que la región de detección se pueda amplificar por el método de amplificación de ácido nucleico mencionado antes. El número de bases del cebador de amplificación en general está dentro del intervalo de 5 - 40 bases, preferiblemente de 15 - 30 bases, más preferiblemente de 18 - 25 bases. La distancia entre los cebadores de amplificación, es decir, la región de detección, en general está dentro del intervalo de 50 - 5000 bases, preferiblemente de 100 - 2000 bases. La secuencia del cebador de amplificación no está particularmente limitada siempre que pueda amplificar una región de detección que contenga al menos una parte del sitio diana de detección, preferiblemente un sitio particular donde se va a detectar una diferencia en la secuencia de bases, por el método de amplificación de ácido nucleico mencionado antes, y el valor de T_m está en general dentro del intervalo de 50°C a 65°C, preferiblemente de 55°C a 60°C. Un sitio diana de detección puede estar contenido en la secuencia del cebador. La secuencia del cebador de amplificación se puede diseñar manualmente, o se puede usar un software adecuado para el diseño del cebador. Por ejemplo, se puede usar el software Primer3 (<http://frodo.wi.mit.edu>) y similares.

El tampón mencionado antes tiene un pH óptimo y una concentración de sal óptima que proporciona la actividad mencionada de la ADN polimerasa. Además, puede contener ribonucleasa H (RNasaH), transcriptasa inversa (RT) y similares, dependiendo del método de amplificación de ácido nucleico que se use. Aunque están disponibles en el mercado varios tipos de la mezcla de reacción para la amplificación de ácido nucleico para las reacciones de los respectivos métodos de amplificación de ácido nucleico, también se puede usar uno disponible en el mercado unido a un kit. Cuando se usa la ADN polimerasa Taq como una enzima, una composición básica de ejemplo de la mezcla de reacción para la amplificación del gen es Tris-HCl 10 mM (pH 8,3)/KCl 50 mM/MgCl₂ 2 mM/2,5 U de ADN polimerasa Taq. No es necesario decir que las condiciones no están limitadas a estas.

Como la cantidad del ácido nucleico para ser el molde en la mezcla de reacción, cualquier cantidad es suficiente siempre que corresponda en general a 10² - 10⁶ moléculas; por ejemplo, es aproximadamente 0,3 ng - 3 μ g para gen humano. Cuando la cantidad del molde es demasiado alta, aumenta la frecuencia de amplificación no específica. Por lo tanto, la cantidad de ácido nucleico que se va a añadir a la mezcla de reacción se suprime preferiblemente a 0,5 μ g o menos por 100 μ g.

Como la cantidad de ácido nucleico abrazadera de la mezcla de reacción, puesto que el ácido nucleico de tipo natural en general está de forma muy mayoritaria con respecto al ácido nucleico mutado en una muestra de ensayo, preferiblemente se añade en un ligero exceso.

La reacción de amplificación de ácido nucleico mencionada antes se lleva a cabo en la mezcla de reacción mencionada antes que contiene ácido nucleico en una muestra de ensayo y ácido nucleico abrazadera. El ácido nucleico abrazadera se une fuertemente a una secuencia complementaria presente en un ácido nucleico no diana de detección, e inhibe la reasociación del cebador y/o la elongación del cebador durante la reacción de amplificación. Por otro lado, el ácido nucleico abrazadera usado en la presente invención muestra una alta capacidad de reconocimiento de bases, y la presencia de emparejamientos erróneos incluso en una sola base disminuye drásticamente la capacidad de unión al molde, lo que permite la amplificación del ácido nucleico diana de detección de acuerdo con la reacción de amplificación convencional. Como resultado, se amplifica selectivamente una región de detección que contiene al menos una parte del sitio diana de detección en el ácido nucleico diana de detección.

(2) Etapa de detección del ácido nucleico amplificado

En esta etapa, se detecta la región de detección del ácido nucleico amplificado en la etapa (1) mencionada antes. Para la detección, se puede usar cualquier método siempre que pueda confirmar la amplificación de la región de detección del ácido nucleico diana de detección. El método de detección se divide principalmente en un método de detección del producto final de una reacción de amplificación y un método de confirmación de la amplificación a lo largo del tiempo durante la reacción de amplificación. Para ambos grupos, se pueden obtener resultados con mayor fiabilidad en comparación con los resultados de cada control adecuado. Además, se pueden obtener resultados más precisos confirmando la secuencia de bases del sitio diana de detección en el producto de amplificación por un método de secuencia directa y similares.

Los ejemplos del método para detectar el producto final de la reacción de amplificación incluyen un método que incluye un tratamiento de desproteinización de la solución después de la reacción de amplificación con una solución de fenol-cloroformo (1:1), purificación de la capa acuosa directamente o usando precipitación con etanol o un kit de purificación adecuado, y medición de la absorbancia a la longitud de onda de 260 nm mediante un espectrofotómetro de absorción; un método que incluye el desarrollo del producto de amplificación en un gel de agarosa o gel de poliacrilamida por electroforesis, y detección por el método de hibridación Southern usando una sonda adecuada; un método que incluye la detección por el método de cromatohibridación que usa nanopartículas de oro; un método que incluye la medición de la turbidez de una solución del ácido nucleico amplificado; un método que incluye el marcaje de fluorescencia del extremo 5' del cebador de amplificación previamente, electroforesis usando gel de agarosa o gel de poliacrilamida después de la reacción de amplificación, captura de la luminiscencia de fluorescencia en una placa de generación de imagen y detección usando un aparato de detección adecuado, y similares.

Como método para confirmar la amplificación a lo largo del tiempo durante la reacción de amplificación, se puede

mencionar un método que incluye la detección, a lo largo del tiempo, de un aumento en la intensidad de fluorescencia que refleja un aumento en el producto de amplificación. Para ser específicos, por ejemplo, se pueden mencionar el método de la PCR en tiempo real, tal como el método de intercalador (Higuchi et al., *BioTechnology* 10, 413-417 (1992)), el método de sonda TaqMan™ (patentes de EE.UU. n° 5210015, 5538848), el método de la sonda de ciclado (Bekkaoui et al., *Biotechniques* 20, 240-248 (1996)) y similares, y se prefiere el método de la sonda TaqMan™ y el método de la sonda de ciclado, ya que son superiores en la sensibilidad de detección y la precisión. Para el método de la PCR en tiempo real, es necesario un aparato exclusivo que integre un termociclador y un espectrofluorofotómetro. Como dichos aparatos se pueden mencionar, por ejemplo, StepOnePlus (ABI), LightCyclerNano (Roche) y similares.

10 Como el método de detección usado preferiblemente en esta etapa, se puede mencionar un método que usa una sonda de detección que es un ácido nucleico de una cadena que tiene una secuencia de bases completamente complementaria a la secuencia de bases de una región que contiene un sitio particular en el que se va a detectar una diferencia en la secuencia de bases en el ácido nucleico diana de detección. Para ser específicos, por ejemplo, es un método que usa una sonda diseñada para tener dicha secuencia de bases en el método de hibridación Southern, el método de la sonda TaqMan™, el método de la sonda de ciclado, y similares.

15 El intercalador es un reactivo que se une específicamente entre pares de bases de ácido nucleico de doble cadena y emite fluorescencia, y emite fluorescencia cuando se irradia luz de excitación. La cantidad de producto de elongación del cebador se puede saber basándose en la detección de la intensidad de fluorescencia derivada del intercalador. En la presente invención, se puede usar cualquier intercalador usado generalmente en el campo, por ejemplo, SYBR™ Green I (Molecular Probe), bromuro de etidio, fluoreno y similares.

20 El método de la sonda TaqMan™ es un método para detectar de manera muy sensible y cuantitativa el ácido nucleico en trazas objetivo por un método de PCR en tiempo real usando una sonda de oligonucleótido que hibrida con una región particular del ácido nucleico diana, en donde un extremo (en general, 5'-terminal) está marcado con un grupo de fluorescencia (indicador) y el otro extremo (en general, 3'-terminal) está marcado con un grupo de atenuación. En la sonda en un estado normal, la fluorescencia del indicador es suprimida por un grupo de atenuación. Mientras hibrida completamente esta sonda de fluorescencia con la región de detección, la PCR se lleva a cabo desde el exterior de la misma usando una ADN polimerasa. Cuando se produce una reacción de elongación por la ADN polimerasa, su actividad de exonucleasa produce la hidrólisis de la sonda de fluorescencia para liberar un colorante indicador, por lo cual se emite fluorescencia. El nivel inicial del ácido nucleico que va a ser el molde se puede cuantificar con precisión mediante el seguimiento en tiempo real de la intensidad de la fluorescencia.

25 Una sonda que se va a usar en la presente invención es una sonda de marcaje de fluorescencia que contiene una secuencia de bases de un producto de elongación del cebador que se predice que se amplificará cuando se realice una PCR en tiempo real. En general, cuando se alarga la longitud de una sonda, la capacidad de unión a una secuencia complementaria se vuelve más fuerte y, por lo tanto, es necesario un cierto nivel de longitud. Sin embargo, cuando la sonda se hace larga, la especificidad de la base tiende a hacerse baja, y por lo tanto, la longitud no debe ser demasiado larga. La longitud de la sonda específica es en general de 5 - 40 unidades monómeras, preferiblemente de 8 - 35 unidades monómeras, más preferiblemente 10 - 25 unidades monómeras. La sonda está constituida por ácidos nucleicos tales como ADN, ARN y similares, o ácidos nucleicos modificados tales como LNA, BNA y similares, o una de sus combinaciones. Como se ha mencionado antes, puesto que el BNA es superior al ADN, ARN y similares en la capacidad de unión a una secuencia complementaria, capacidad de reconocimiento de bases y resistencia a enzimas de degradación, la sonda contiene preferiblemente la estructura unitaria de BNA. Como una estructura unitaria preferible (es decir, un análogo de nucleósido) cuando la sonda contiene la estructura unitaria de BNA, se pueden aplicar las mencionadas antes para el ácido nucleico abrazadera. Cuando se usa una sonda que tiene una secuencia de bases completamente complementaria a una región que contiene un sitio particular en el que se va a detectar una diferencia en la secuencia de bases en el ácido nucleico diana de detección, una región en una sonda correspondiente a la región es preferiblemente la estructura unitaria de BNA.

35 Los ejemplos de la sustancia fluorescente indicadora mencionada antes incluyen carboxifluoresceína (FAM), hexaclorofluoresceína (HEX), tetraclorofluoresceína (TET), Cy5 (Amersham Biosciences, Inc.) y similares. De estos, se prefiere FAM. Los ejemplos del colorante de atenuación incluyen sustancias fluorescentes tales como carboxitetrametilrodamina (TAMRA) y similares, sustancias no fluorescentes como el colorante Black Hole Quencher (p. ej., BHQ2), ácido 4-(((4-(dimetilamino)fenil)azo)benzoico (DABCYL) y similares. De estos, se prefiere TAMRA.

40 La sonda se puede preparar basándose en las patentes de EE.UU. n° 5210015 y 5538848 mencionadas antes, o los documentos mencionados antes con respecto a la síntesis del ácido nucleico abrazadera y similares. Alternativamente, se puede usar la síntesis encargada a una empresa adecuada.

45 El método de la sonda de ciclado es un método de detección muy sensible por una combinación de una sonda de quimera compuesta de ARN y ADN y RNasa H. Un lado de la sonda a través de la región de ARN está marcado con una sustancia fluorescente (indicador) y el otro está marcado con una sustancia que atenúa la fluorescencia (atenuador). Mientras que la sonda en un estado intacto no emite fluorescencia al atenuarse, cuando la región de ARN es escindida por la RNasa H después de formar un híbrido de la secuencia con un producto de amplificación complementario, se emite una fuerte fluorescencia. El nivel del producto de amplificación se puede seguir midiendo

la intensidad de la fluorescencia. Cuando existe un emparejamiento erróneo cerca del ARN de la sonda de ciclado, no se produce la escisión por la ARNasa H. Por lo tanto, es posible una detección muy específica capaz de o que reconoce una diferencia incluso en una sola base.

Se puede obtener una sonda de ciclado encargando el diseño y su síntesis a una empresa adecuada.

5 Kit para la detección de mutaciones

La presente invención también proporciona un kit que se puede usar para poner en práctica el método de la presente invención (en lo sucesivo, denominado también el kit de la presente invención). El kit de la presente invención contiene (a) un ácido nucleico abrazadera que tiene una secuencia de bases complementaria a la secuencia de bases del sitio diana de detección de un ácido nucleico no diana de detección, y (b) un reactivo para amplificar selectivamente una región que contiene al menos una parte del sitio diana de detección del ácido nucleico diana de detección en la muestra de ensayo.

Realizaciones preferibles y ejemplos específicos del ácido nucleico abrazadera de (a) mencionado antes son como se explican para el método de la presente invención.

Si bien el reactivo de (b) mencionado antes es un reactivo para llevar a cabo el método de amplificación de ácido nucleico, como se explica para el método de la presente invención, el kit de la presente invención puede no contener necesariamente todos los reactivos esenciales para llevar a cabo el método de amplificación.

El kit de la presente invención contiene preferiblemente el cebador de amplificación mencionado antes como el reactivo de (b). El cebador de amplificación es típicamente un cebador de amplificación para PCR.

El kit de la presente invención puede contener además uno o más de trifosfato de nucleósido, ácido nucleico sintasa y tampón para la reacción de amplificación. El trifosfato de nucleósido es un sustrato de acuerdo con la ácido nucleico sintasa (dNTP, rNTP, etc.). La ácido nucleico sintasa es una enzima de acuerdo con un método de amplificación de ácido nucleico para el que se usa el kit, e incluye ADN polimerasa, ARN polimerasa, transcriptasa inversa y similares adecuadas. Los ejemplos del tampón para la reacción de amplificación incluyen tampones usados para llevar a cabo la reacción de amplificación de ácido nucleico general y la reacción de hibridación, tales como el tampón tris, tampón de fosfato, tampón veronal, tampón de borato, tampón Good y similares. Aunque el pH no está particularmente limitado, en general está preferiblemente dentro del intervalo de 5 - 9.

El kit de la presente invención también puede contener un reactivo para llevar a cabo un método de detección tal como los explicados para el método de la presente invención. Los ejemplos preferidos del reactivo incluyen intercalador, sonda de marcaje de fluorescencia, sonda de ciclado y similares, que se usan para la PCR en tiempo real mencionada antes. Además, los reactivos que no inhiben la estabilidad de los reactivos coexistentes y similares, y que no inhiben la reacción de amplificación de ácido nucleico y la reacción de hibridación, también pueden estar contenidos, tales como estabilizantes, conservantes y similares. La concentración de estos se puede seleccionar adecuadamente del intervalo de concentración usado en general en el campo.

La presente invención se explica con más detalle a continuación haciendo referencia a los ejemplos, que no deben interpretarse como limitativos.

Ejemplos

Material y un aparato

En las Tablas 1-1 y 1-2 se muestran diversos oligonucleótidos usados en los ejemplos. La síntesis de estos oligonucleótidos se encargó a GeneDesign Inc., Greiner-Japan Co., Ltd., Biologica Co. y similares. El BNA usado tiene el análogo de nucleósido mencionado antes de la fórmula (I) en donde R_1 es un grupo metilo, m es 0, y n_1 es 1 como una estructura unitaria.

Tabla 1-1

Varios oligonucleótidos para el ensayo de mutación del gen KRAS

Tipo de oligonucleótido	Nombre del oligonucleótido	Secuencia (5'→3') y modificación química	longitud (unidad monómera)	SEQ ID NO:
Cebador directo	Oligo 1	actgaatataaaacttgtggtag	22	3
Cebador inverso	Oligo 2	attgttggatcaatattcgctc	20	4
sonda de amplificación de ácido nucleico	Oligo 3	F-cttgcagatcacagctcaatttcagaatcat-R	28	5
sonda de amplificación de ácido nucleico	Oligo 3-2	J-cttgcagatcacagctcaatttcagaatcat-R	28	6
abrazadera de BNA de 10 u. monómeras	Oligo 4	CgCCACCAgC-P	10	7
abrazadera de BNA de 10 u. monómeras	Oligo 4-2	CGCCACCAgC-P	10	19
abrazadera de BNA de 13 u. monómeras	Oligo 5	tAcgCCACCAgCl-P	13	8
abrazadera de BNA de 18 u. monómeras	Oligo 6	gCCTAcGgCCACCAgClcc-P	18	9
abrazadera de LNA de 10 u. monómeras	Oligo 7	CgCCACCAgC-P	10	10
abrazadera de ADN de 13 u. monómeras	Oligo 8	tAcgccccagct-P	13	11
abrazadera de LNA de 13 u. monómeras	Oligo 9	tAcGcCACCAgCl-P	13	12
abrazadera de PNA de 13 u. monómeras	Oligo 10	tAcgccccagct	13	13
abrazadera de ADN de 18 u. monómeras	Oligo 11	gCctAcgccccagctcc-P	18	14
abrazadera de LNA de 18 u. monómeras	Oligo 12	gCCTAcGgCCACCAgClcc-P	18	15
abrazadera de PNA de 18 u. monómeras	Oligo 13	gCctAcgccccagctcc	18	16
sonda de ADN de detección de G12V	Oligo 14	F-tAcgccccagctcc-R	15	17
sonda de ADN de detección de G12V	Oligo 14-2	F-caacagctcc-R	10	20
sonda de BNA de detección de G12V	Oligo 15	F-tAcgccccagctcc-R	15	18
sonda de BNA de detección de G12V	Oligo 15-2	F-caACAgClcc-R	10	21
sonda de ADN de detección de G12D	Oligo 16	F-tAcgccccagctcc-R	15	22
sonda de ADN de detección de G13D	Oligo 17	F-tAcgctcaacagctcc-R	15	23
sonda de ADN de detección de G12A	Oligo 18	F-tAcgccccagctcc-R	15	24
sonda de ADN de detección de G12C	Oligo 19	F-tAcgccccagctcc-R	15	25
sonda de ADN de detección de G12S	Oligo 20	F-tAcgccccagctcc-R	15	26
sonda de ADN de detección de G12R	Oligo 21	F-tAcgccccagctcc-R	15	27

a, c, g, t = DNA-A, -C, -G, -T

A, C, G, T = LNA-A, -^mC, -G, -T; **f**, **c**, **g** - 2'-OMe-RNA-U, -C, -G

A, **C**, **G**, **I** = 2',4'-BNA^N(N-Me)-A, -^mC, -G, -T; **a**, **c**, **g**, **f** = PNA-A, -C, -G, -T

F = FAM; J = JOE; R = TAMRA; P = monofosforilación

Tabla 1-2

Varios oligonucleótidos para el ensayo de mutación del gen EGFR

Tipo de oligonucleótido	Nombre oligonucleótido	del	Secuencia (5'→3') modificación química	y	longitud (unidad monómera)	SEQ ID NO:
Cebador directo	Oligo 22		lggcacccatctcaccaattgc		20	28
Cebador inverso	Oligo 23		acacagcaaaagcagaaactc		20	29
sonda de amplificación de ácido nucleico	Oligo 24		J-ccgaaagcccaacaaggaaatcctcga-R		26	30
abrazadera de BNA	Oligo 25		<u>g</u> ttgc <u>t</u> ttctcttaat <u>t</u> cc-P		18	31
sonda de ADN para detección de E746-A750 del (Tipo 1)	Oligo 26		F-tcccgctcgctatcaaacatct-R		22	32
abrazadera de LNA	Oligo 27		<u>g</u> ttgc <u>t</u> ttctcttaat <u>t</u> cc-P		18	33
abrazadera de PNA	Oligo 28		<u>g</u> ttgc <u>t</u> ttctcttaat <u>t</u> cc		18	34
abrazadera de ADN	Oligo 29		<u>g</u> ttgc <u>t</u> ttctcttaat <u>t</u> cc-P		18	35

a, c, g, t = DNA-A, -C, -G, -T; C, I = 2',4' -BNA^{NC}(N-H) - ^mC, -T

C, **T** = LNA-^mC, -T; **g** = 2'-CMe-RNA-G; **a**, **g**, **t** = PNA-A, -C, -G, -T

F = FAM; **J**=JOE; **R** = TAMRA; **P** = monofosforilación

Ejemplo 1

Experimento de detección 1 de la mutación G12V del gen KRAS en una muestra de ensayo modelo (efecto abrazadera de varios oligonucleótidos BNA)

(1) Muestra de ensayo

5 El ADN genómico humano disponible en el mercado se usó como una muestra de gen de tipo natural del gen KRAS y se usó un ADN extraído de células cultivadas SW480 como una muestra de gen mutado G12V. La cantidad de cada ADN se determinó a partir del espectro UV de cada muestra y el valor de Ct se obtuvo por PCR en tiempo real usando los oligómeros 1, 2 y 3 como cebador directo, cebador inverso y sonda de amplificación de ácido nucleico. Basándose en su cantidad de ADN, se produjeron muestras de ensayo modelo que tenían un tipo de mutación de
10 100%, 10%, 1,0%, 0,1%, 0,01% o 0%, y se usaron las respectivas muestras de ensayo modelo en una cantidad de 50 ng por cada experimento

(2) Aparato de amplificación de ácido nucleico y reactivo para la amplificación de ácido nucleico

Se usó StepOnePlus (fabricado por ABI) como un aparato de PCR en tiempo real y se usó TaqMan™ Fast Advanced Master Mix (fabricado por ABI) como los reactivos para la amplificación de ácido nucleico. La cantidad de reactivo a usar estaba de acuerdo con el manual adjunto.
15

(3) Cebador, sonda de amplificación de ácido nucleico y ácido nucleico abrazadera

Se usaron oligo 1 y oligo 2 (cada uno 10 pmol) por experimento como cebadores directo e inverso, y se usó el oligo 3 (2,5 pmol) por experimento como una sonda de amplificación de ácido nucleico. Como ácido nucleico abrazadera, se usaron los oligo 4 - 6 (oligonucleótidos BNA) con 10 pmol por experimento.

20 (4) Operación y resultados de la amplificación de ácidos nucleicos.

Una mezcla de los (1) - (3) mencionados antes de las muestras de ensayo, reactivo para la amplificación de ácido nucleico, cebador, sonda de amplificación de ácido nucleico y ácido nucleico abrazadera, se sometió a (i) 50°C durante 2 min, (ii) 95°C durante 20 s, (iii) 95°C durante 10 s, (iv) 57°C durante 60 s, después de lo cual (v) se repitieron las operaciones de (iii) - (iv) 55 veces en un aparato de amplificación de ácidos nucleicos. Las curvas de
25 amplificación de ácidos nucleicos que siguen los procesos de amplificación del ácido nucleico (hasta 45 ciclos) que usan una sonda de amplificación de ácido nucleico, cada muestra de ensayo y cada ácido nucleico abrazadera, se muestran en las figs. 2 - 4, y los datos del valor Ct se muestran en la tabla 2. En la tabla, M es un tipo de mutación y W es un tipo natural. El valor de Ct significa el número de ciclos cuando un producto de amplificación de PCR ha alcanzado un nivel dado, y el valor de ΔCt significa una diferencia en los valores de Ct entre la muestra mutada al
30 0% y cada muestra de ensayo.

Tabla 2

Datos de valores de Ct en la PCR en tiempo real usando cada oligonucleótido BNA (oligo 4-6) para el ácido nucleico abrazadera en el ejemplo 1

Oligo 4						
M/(M+W)	100%	10%	1%	0,1%	0,01%	0%
Valor Ct	23,44	26,89	30,23	32,94	33,93	34,13
ΔCt (0%-X%)	10,69	7,24	3,90	1,19	0,20	

Oligo 5						
M/(M+W)	100%	10%	1%	0,1%	0,01%	0%
Valor Ct	23,58	26,93	30,09	33,23	34,67	34,87
ΔCt (0%-X%)	11,29	7,94	4,78	1,64	0,20	

Oligo 6						
M/(M+W)	100%	10%	1%	0,1%	0,01%	0%
Valor Ct	24,51	27,96	31,61	34,66	36,09	36,23
ΔCt (0%-X%)	11,72	8,27	4,62	1,57	0,15	

En cualquiera de los oligonucleótidos BNA de 10 - 18 unidades monómeras (oligo 4 - 6), se encontró una gran diferencia en la curva de amplificación de ácido nucleico y un valor de Ct entre 1% y 0% de la proporción del gen mutado en la muestra de ensayo (M/(M+W)), y se aclaró que pueden distinguirse ambos.

40 (5) Resultados del análisis de secuencia directo después de la operación de amplificación de ácido nucleico

Se muestra en la fig. 5 una tabla de análisis de secuencia de bases de los alrededores del codón 12, que se obtuvo

por análisis de secuencia directo de un producto de amplificación después de 55 ciclos de amplificación de ácido nucleico de cada muestra de ensayo (muestra mixta de genes 100% - 0% de (M/(M+W))) por PCR en tiempo real por el método de abrazadera de BNA mencionado antes que usa oligo 6. A partir de la figura, se puede confirmar la presencia de un gen mutado incluso en una muestra de ensayo con $M/(M+W) = 0,1\%$, de acuerdo con el análisis de secuencia directa de la amplificación de ácido nucleico por el método de abrazadera de BNA. Es decir, se ha aclarado que la sensibilidad de detección del tipo de mutación no es mayor de 0,1%.

Ejemplo 2

Experimento de detección 2 de la mutación G12V del gen KRAS en una muestra de ensayo modelo (comparación del efecto abrazadera de BNA y ADN, LNA y PNA)

(1) Muestra de ensayo

Se usó el ADN genómico humano disponible en el mercado como una muestra de gen de tipo natural del gen KRAS y se usó un ADN extraído de células cultivadas SW480 como una muestra de gen mutado G12V. La cantidad de cada ADN se determinó a partir del espectro UV de cada muestra y el valor de Ct se obtuvo por PCR en tiempo real usando oligo 1, 2 y 3 como cebador directo, cebador inverso y sonda de amplificación de ácido nucleico. Basándose en su cantidad de ADN, se produjeron muestras de ensayo modelo con un tipo de mutación de 100%, 10%, 1,0%, 0,1%, 0,01% o 0%, y se usaron las respectivas muestras de ensayo modelo en una cantidad de 50 ng por cada experimento.

(2) Aparato de amplificación de ácido nucleico y reactivo para la amplificación de ácido nucleico

Se usó StepOnePlus (fabricado por ABI) como un aparato de PCR en tiempo real y se usó TaqMan™ Fast Advanced Master Mix (fabricado por ABI) como los reactivos para la amplificación de ácido nucleico. La cantidad de reactivo a usar estaba de acuerdo con el manual adjunto.

(3) Cebador, sonda de amplificación de ácido nucleico y ácido nucleico abrazadera

Se usaron oligo 1 y oligo 2 (cada uno 10 pmol) por experimento como cebadores directo e inverso, y se usó el oligo 3 (2,5 pmol) por experimento como una sonda de amplificación de ácido nucleico. Para la evaluación comparativa del efecto abrazadera, se usaron oligo 5, 6 (BNA), oligo 8, 11 (ADN), oligo 9, 12 (LNA) y oligo 10, 13 (PNA) cada uno 10 pmol por experimento.

(4) Operación y resultados de la amplificación de ácidos nucleicos.

Una mezcla de los (1) - (3) mencionados antes de las muestras de ensayo, reactivo para la amplificación de ácido nucleico, cebador, sonda de amplificación de ácido nucleico y ácido nucleico abrazadera, se sometió a (i) 50°C durante 2 min, (ii) 95°C durante 20 s, (iii) 95°C durante 10 s, (iv) 57°C durante 60 s, después de lo cual (v) se repitieron las operaciones de (iii) - (iv) 55 veces en un aparato de amplificación de ácidos nucleicos. Las curvas de amplificación de genes que siguen los procesos de amplificación del ácido nucleico (hasta 45 ciclos) que usan una sonda de amplificación de ácido nucleico, cada muestra de ensayo y cada ácido nucleico abrazadera, se muestran en las tablas 6 y 7, y los datos del valor Ct se muestran en las tablas 3-4 y las figuras de comparación de los respectivos valores de Ct se muestran en las figuras 8 y 9.

Tabla 3

Datos de valores de Ct en la PCR en tiempo real usando cada ácido nucleico abrazadera de 13 unidades monómeras (oligo 5, 8, 9, 10) en el ejemplo 2

Oligo 5 (BNA)						
M/(M+W)	100%	10%	1%	0,1%	0,01%	0%
Valor Ct	24,25	27,65	31,00	34,30	35,28	36,48
ΔCt (0%-X%)	12,23	8,83	5,48	2,18	1,20	

Oligo 8 (LNA)						
M/(M+W)	100%	10%	1%	0,1%	0,01%	0%
Valor Ct	24,55	24,85	24,66	24,58	24,51	25,43
ΔCt (0%-X%)	0,88	0,58	0,77	0,85	-0,08	

Oligo 9 (PNA)						
M/(M+W)	100%	10%	1%	0,1%	0,01%	0%
Valor Ct	24,24	27,25	29,71	30,40	30,20	29,90
ΔCt (0%-X%)	5,66	2,65	0,19	-0,50	-0,30	

Oligo 10 (ADN)						
M/(M+W)	100%	10%	1%	0,1%	0,01%	0%
Valor Ct	24,56	24,78	24,77	24,78	24,64	24,72
Δ Ct (0%-X%)	0,16	-0,06	-0,05	-0,06	0,08	

Tabla 4

Datos de valores de Ct en la PCR en tiempo real usando cada ácido nucleico abrazadera de 18 unidades monómeras (oligo 6, 11, 12, 13) en el ejemplo 2

Oligo 6 (BNA)						
M/(M+W)	100%	10%	1%	0,1%	0,01%	0%
Valor Ct	25,55	29,28	32,76	35,28	35,16	36,12
Δ Ct (0%-X%)	10,57	6,84	3,36	0,84	0,94	

5

Oligo 11 (ADN)						
M/(M+W)	100%	10%	1%	0,1%	0,01%	0%
Valor Ct	24,45	24,54	24,54	24,62	24,39	24,44
Δ Ct (0%-X%)	-0,01	-0,10	-0,10	-0,18	0,05	

Oligo 12 (LNA)						
M/(M+W)	100%	10%	1%	0,1%	0,01%	0%
Valor Ct	24,59	27,39	28,78	29,03	29,11	28,92
Δ Ct (0%-X%)	4,33	1,53	0,14	-0,12	-0,19	

Oligo 13 (PNA)						
M/(M+W)	100%	10%	1%	0,1%	0,01%	0%
Valor Ct	24,74	28,00	30,59	31,88	31,69	31,55
Δ Ct (0%-X%)	6,81	3,55	0,96	-0,33	-0,14	

10 A partir de estos resultados, se demostró que el oligonucleótido BNA es superior a otros oligonucleótidos en efecto abrazadera.

Ejemplo 3

Experimento de detección 3 de la mutación del gen G12V de KRAS en la muestra de ensayo modelo (efecto de detección de ácido nucleico abrazadera BNA + sonda de detección de mutación)

(1) Muestra de ensayo

15 Se usó el ADN genómico humano disponible en el mercado como una muestra de gen de tipo natural del gen KRAS y se usó un ADN extraído de células cultivadas SW480 como una muestra de gen mutado G12V. La cantidad de cada ADN se determinó a partir del espectro UV de cada muestra y el valor de Ct se obtuvo por PCR en tiempo real usando oligo 1, 2 y 3 como cebador directo, cebador inverso y sonda de amplificación de ácido nucleico. Basándose en su cantidad de ADN, se produjeron muestras de ensayo modelo que tenían un tipo de mutación del 100%, 10%,
20 1,0%, 0,1%, 0,01% o 0%. Se usaron las respectivas muestras de ensayo modelo en una cantidad de 50 ng por cada experimento.

(2) Aparato de amplificación de ácido nucleico y reactivo para la amplificación de ácido nucleico

25 Se usó StepOnePlus (fabricado por ABI) como un aparato de PCR en tiempo real y se usó TaqMan™ Fast Advanced Master Mix (fabricado por ABI) como los reactivos para la amplificación de ácido nucleico. La cantidad de reactivo a usar estaba de acuerdo con el manual adjunto.

(3) Cebador, sonda de amplificación de ácido nucleico, ácido nucleico abrazadera y sonda de detección de mutación

30 Se usaron oligo 1 y oligo 2 (cada uno 10 pmol) por experimento como cebadores directo e inverso, y se usó oligo 3-2 (2,5 pmol) por experimento como una sonda de amplificación de ácido nucleico. Se usó oligo 6 (BNA) (10-1 pmol) por experimento como un ácido nucleico abrazadera, y se usaron oligo 14, oligo 14-2, oligo 15 y oligo 15-2 (5 pmol) por experimento como sonda de detección de mutación.

(4) Operación y resultados de la amplificación de ácidos nucleicos.

Una mezcla de los (1) - (3) mencionados antes de las muestras de ensayo, reactivo para la amplificación de ácido nucleico, cebador, sonda de amplificación de ácido nucleico, ácido nucleico abrazadera y sonda para la detección de

mutación, se sometió a (i) 50°C durante 2 min, (ii) 95°C durante 20 s, (iii) 95°C durante 10 s, (iv) 57°C durante 60 s, después de lo cual (v) se repitieron las operaciones de (iii) - (iv) 55 veces en un aparato de amplificación de ácidos nucleicos. Las curvas de amplificación de ácidos nucleicos que siguen los procesos de amplificación del ácido nucleico (hasta 45 ciclos) que usan 10 pmol de ácido nucleico abrazadera (oligo 6) y una sonda de amplificación de ácido nucleico y una sonda para detección de mutación (oligo 15) en cada muestra de ensayo, y el valor Ct, se muestra en la fig. 10 y fig. 11.

Además, las curvas de amplificación de ácidos nucleicos que siguen los procesos de amplificación de ácidos nucleicos (hasta 55 ciclos) que usan 1 pmol de ácido nucleico abrazadera (oligo 6), y cada uno de los cuatro tipos de sondas mencionados antes para la detección de mutaciones en cada muestra de ensayo, y el valor Ct se muestran en la fig. 12 y fig. 13. Como queda claro a partir de estas figuras y los datos de valores de Ct, se demostró que el uso combinado de la técnica de abrazadera de BNA y la sonda de detección de mutación puede detectar claramente la presencia de un tipo mutado en una muestra de ensayo de ADN que contiene 0,01% del gen KRAS G12V mutado gen de tipo natural, ya que el valor de ΔCt (0%-X%) se convierte en un número alto incluso entre muestras de ensayo con una relación de presencia del gen KRAS tipo G12V mutado $M/(M+W)$ de 0,01% y 0%.

Además, a partir de la comparación del valor de ΔCt de la fig. 12 y fig. 13, se aclaró que el oligonucleótido BNA también tiene una función superior como sonda de detección de mutación. Es decir, el valor de ΔCt de sondas de detección de mutaciones de BNA de 15 unidades monómeras, 10 unidades monómeras en cada concentración de muestra, es mayor que el valor de ΔCt de la sonda de ADN correspondiente. En particular, en el caso de una sonda de una sola cadena (10 unidades monómeras), la diferencia en el valor de ΔCt es notablemente grande.

Ejemplo 4

Experimento para la detección de 7 mutaciones principales (G12V, G12D, G13D, G12C, G12A, G12S, G12R) del gen KRAS en una muestra de ensayo modelo (método abrazadera de BNA + sonda de detección de mutación)

(1) Muestra de ensayo

Como muestras de genes de tipo natural y de cada tipo de mutación de gen KRAS, se usaron los correspondientes ADN genómicos humanos disponibles en el mercado. La cantidad de cada ADN se determinó a partir del espectro UV de cada muestra y el valor de Ct se obtuvo por PCR en tiempo real usando oligo 1, 2 y 3 como cebador directo, cebador inverso y sonda de amplificación de ácido nucleico. Basándose en su cantidad de ADN, se produjeron muestras de ensayo modelo que tenían un tipo de mutación del 100%, 10%, 1,0%, 0,1%, 0,01% o 0%, y se usaron las respectivas muestras de ensayo modelo en una cantidad de 50 ng por cada experimento.

(2) Aparato de amplificación de ácido nucleico y reactivo para la amplificación de ácido nucleico

Se usó StepOnePlus (fabricado por ABI) como un aparato de PCR en tiempo real y se usó TaqMan™ Fast Advanced Master Mix (fabricado por ABI) como los reactivos para la amplificación de ácido nucleico. La cantidad de reactivo a usar estaba de acuerdo con el manual adjunto.

(3) Cebador, sonda de amplificación de ácido nucleico y ácido nucleico abrazadera

Se usaron oligo 1 y oligo 2 (cada uno 10 pmol) por experimento como cebadores directo e inverso, y se usó oligo 3-2 (2,5 pmol) por experimento como una sonda de amplificación de ácido nucleico. Como ácido nucleico abrazadera, se usó oligo 6 (oligonucleótidos BNA) con 10 pmol por experimento.

Además, como una sonda para reconocer y detectar selectivamente cada tipo de mutación, se usaron sondas de detección de mutación correspondientes a los respectivos tipos de mutación (oligo 14 [para G12V], oligo 16 [para G12D], oligo 17 [para G13D], oligo 18 [para G12A], oligo 19 [para G12C], oligo 20 [para G12S] y oligo 21 [para G12R]) con 5 pmol por experimento.

(4) Operación y resultados de la amplificación de ácidos nucleicos.

Una mezcla de los (1) - (3) mencionados antes de las muestras de prueba, reactivo para la amplificación de ácido nucleico, cebador, cada sonda y el ácido nucleico abrazadera, se sometió a (i) 50°C durante 2 min, (ii) 95°C durante 20 s, (iii) 95°C durante 10 s, (iv) 57°C (54°C cuando la diana era G12D) durante 60 s, después de lo cual (v) se repitieron las operaciones de (iii) - (iv) 55 veces en un aparato de amplificación de ácido nucleico.

Las curvas de amplificación de ácidos nucleicos que siguen la amplificación de ácido nucleico, que usan una sonda de amplificación de ácido nucleico y cada sonda de detección de mutación, en los procesos de amplificación de ácido nucleico (hasta 45 - 55 ciclos) de cada muestra de ensayo de mutación del gen KRAS, se muestran en las figs. 14 - 20, y los datos del valor de Ct se muestran en la tabla 5 y tabla 6. Estos datos han aclarado que, en cualquiera de las 7 mutaciones principales del gen KRAS, este método de abrazadera de BNA es una técnica capaz de detectar la presencia o ausencia de cada mutación con alta sensibilidad (hasta casi aproximadamente 0,1%) en la evaluación usando solo una sonda de amplificación de ácido nucleico para seguir toda la amplificación de ácido nucleico, y capaz de detectar la presencia o ausencia de cada mutación y modo de mutación con mayor sensibilidad

ES 2 701 235 T3

(<0,1%) en la evaluación usando cada sonda para la detección de mutaciones.

Tabla 5

Sonda de amplificación de ácido nucleico que se dirige a 7 mutaciones del gen KRAS en el ejemplo 4

Datos de valores de Ct de (oligo 3-2)

5

diana: G12V, oligo abrazadera: oligo 6, seguimiento de amplificación: oligo 3-2					
M/(M+W) (%)	10%	1%	0,1%	0,01%	0%
Valor Ct	28,72	32,31	35,51	37,09	37,97
Valor ΔCt (0%-X%)	9,25	5,66	2,46	0,88	

diana: G12D, oligo abrazadera: oligo 6, seguimiento de amplificación: oligo 3-2					
M/(M+W) (%)	10%	1%	0,1%	0,01%	0%
Valor Ct	34,11	37,58	40,57	41,21	40,52
Valor ΔCt (0%-X%)	6,41	2,94	-0,05	-0,69	

diana: G13D, oligo abrazadera: oligo 6, seguimiento de amplificación: oligo 3-2					
M/(M+W) (%)	10%	1%	0,1%	0,01%	0%
Valor Ct	30,15	33,42	35,93	37,10	37,07
Valor ΔCt (0%-X%)	6,92	3,65	1,14	-0,03	

diana: G12A, oligo abrazadera: oligo 6, seguimiento de amplificación: oligo 3-2					
M/(M+W) (%)	10%	1%	0,1%	0,01%	0%
Valor Ct	28,76	32,15	34,95	38,17	37,71
Valor ΔCt (0%-X%)	8,95	5,56	2,77	-0,46	

diana: G12C, oligo abrazadera: oligo 6, seguimiento de amplificación: oligo 3-2					
M/(M+W) (%)	10%	1%	0,1%	0,01%	0%
Valor Ct	30,23	34,04	36,75	38,67	38,55
Valor ΔCt (0%-X%)	8,32	4,51	1,80	-0,12	

10

diana: G12S, oligo abrazadera: oligo 6, seguimiento de amplificación: oligo 3-2					
M/(M+W) (%)	10%	1%	0,1%	0,01%	0%
Valor Ct	30,19	33,53	35,76	36,61	37,04
Valor ΔCt (0%-X%)	6,85	3,51	1,28	0,43	

diana: G12R, oligo abrazadera: oligo 6, seguimiento de amplificación: oligo 3-2					
M/(M+W) (%)	10%	1%	0,1%	0,01%	0%
Valor Ct	28,78	32,44	35,52	36,98	37,11
Valor ΔCt (0%-X%)	8,32	4,66	1,58	0,13	

Tabla 6

Sonda de amplificación de ácido nucleico que se dirige a 7 mutaciones del gen KRAS en el ejemplo 4

Datos de valores de Ct

15

diana: G12V, oligo abrazadera: oligo 6, seguimiento de amplificación: oligo 14					
M/(M+W) (%)	10%	1%	0,1%	0,01%	0%
Valor Ct	26,50	30,68	34,37	38,04	> 55
Valor ΔCt (0%-X%)	> 28,50	> 24,32	> 20,63	> 16,96	

diana: G12D, oligo abrazadera: oligo 6, seguimiento de amplificación: oligo 16					
M/(M+W) (%)	10%	1%	0,1%	0,01%	0%
Valor Ct	34,11	37,51	42,32	> 55	> 55
Valor ΔCt (0%-X%)	> 20,89	> 17,49	> 12,68	-	

diana: G13D, oligo abrazadera: oligo 6, seguimiento de amplificación: oligo 17					
M/(M+W) (%)	10%	1%	0,1%	0,01%	0%
Valor Ct	30,76	34,26	38,51	40,87	> 55
Valor ΔCt (0%-X%)	> 24,24	> 20,74	> 16,49	> 14,13	

diana: G12A, oligo abrazadera: oligo 6, seguimiento de amplificación: oligo 18					
M/(M+W) (%)	10%	1%	0,1%	0,01%	0%
Valor Ct	27,91	31,31	34,44	38,92	> 55
Valor ΔCt (0%-X%)	> 27,09	> 23,69	> 20,56	> 16,08	

diana: G12C, oligo abrazadera: oligo 6, seguimiento de amplificación: oligo 19					
M/(M+W) (%)	10%	1%	0,1%	0,01%	0%
Valor Ct	30,69	34,51	39,01	44,04	> 55
Valor ΔCt (0%-X%)	> 24,31	> 20,49	> 15,99	> 10,96	

diana: G12S, oligo abrazadera: oligo 6, seguimiento de amplificación: oligo 20					
M/(M+W) (%)	10%	1%	0,1%	0,01%	0%
Valor Ct	29,59	32,63	36,41	38,95	> 55
Valor ΔCt (0%-X%)	> 25,41	> 22,37	> 18,59	> 16,05	

diana: G12R, oligo abrazadera: oligo 6, seguimiento de amplificación: oligo 21					
M/(M+W) (%)	10%	1%	0,1%	0,01%	0%
Valor Ct	28,05	31,95	35,30	38,97	> 55
Valor ΔCt (0%-X%)	> 26, 95	> 23,05	> 19,70	> 16,03	

5

Ejemplo 5

Detección de la mutación G12V del gen KRAS por el método abrazadera de BNA usando ADN derivado de tejido FFPE de pacientes con cáncer como muestra

(1) Muestra de ensayo

- 10 Se usaron el ADN genómico y ADN genómico del gen KRAS G12V mutado extraído de la muestra de tejido clínico FFPE disponible en el mercado (KRAS de tipo natural). La cantidad de cada ADN se determinó a partir del espectro UV de cada muestra y el valor de Ct se obtuvo por PCR en tiempo real usando oligo 1, 2 y 3 como cebador directo, cebador inverso y sonda de amplificación de ácido nucleico. Basándose en su cantidad de ADN, se produjeron muestras de ensayo mixtas que tenían un tipo de mutación G12V de 1,0%, 0,5%, 0,1%, 0,05% o 0%, y se usaron las
- 15 respectivas muestras de ensayo en una cantidad de 20 ng por cada experimento.

(2) Aparato de amplificación de ácido nucleico y reactivo para la amplificación de ácido nucleico

Se usaron un aparato y reactivos similares a los del ejemplo 4.

(3) Cebador, sonda de amplificación de ácido nucleico, abrazadera de ácido nucleico y sonda de detección de mutación

- 20 Se usaron oligo 1 y oligo 2 (cada 20 pmol) por experimento como cebadores directo e inverso, y se usó oligo 3-2 (5 pmol) por experimento como una sonda de amplificación de ácido nucleico. Como ácido nucleico abrazadera de BNA, se usaron oligo 4-2, oligo 5 y oligo 6 (oligonucleótidos BNA) con 20 pmol por experimento.

Como una sonda de detección de mutaciones para detectar selectivamente el tipo de mutación G12V, se usó oligo 14 con 10 pmol por experimento.

- 25 (4) Operación y resultados de la amplificación de ácidos nucleicos.

- 30 Una mezcla de los (1) - (3) mencionados antes de las muestras de prueba, reactivo para la amplificación de ácido nucleico, cebador, sonda para la amplificación de ácido nucleico, ácido nucleico abrazadera y sonda para la detección de mutaciones, se sometió a (i) 50°C durante 2 min, (ii) 95°C durante 20 s, (iii) 95°C durante 10 s, (iv) 57°C durante 60 s, después de lo cual (v) se repitieron las operaciones de (iii) - (iv) 45-55 veces en un aparato de amplificación de ácido nucleico. Las curvas de amplificación de ácido nucleico que seguían los procesos de amplificación de ácido nucleico (hasta 45 ciclos) que usan una sonda de amplificación de ácido nucleico y cada sonda para la detección de mutaciones en cada muestra de ensayo, se muestran en las figs. 21 - 23. Además, los datos de valores de Ct en este experimento se muestran colectivamente en la tabla 7.

- 35 Estos datos han aclarado que, incluso cuando se usa un ADN derivado de tejido de pacientes FFPE como muestra de ensayo, un método de amplificación de ácido nucleico que usa el presente método de abrazadera de BNA y una sonda de detección de mutación en combinación, pueden detectar y analizar una mutación puntual del gen KRAS, en cuanto a la presencia o ausencia de la mutación y el modo de mutación, con alta sensibilidad (casi aproximadamente 0,1%).

Tabla 7

Datos de valores de Ct que se dirigen a la mutación G12V del gen KRAS en el ejemplo 5

oligo abrazadera: oligo 4-2, seguimiento de amplificación: oligo 3-2					
M/(M+W) (%)	1%	0,5%	0,1%	0,05%	0%
Valor Ct	34,47	35,48	36,75	37,72	38,48
Valor ΔCt (0%-X%)	4,00	2,99	1,73	0,75	

oligo abrazadera: oligo 4-2, seguimiento de amplificación: oligo 14					
M/(M+W) (%)	1%	0,5%	0,1%	0,05%	0%
Valor Ct	30,63	31,77	33,62	35,35	> 55
Valor ΔCt (0%-X%)	> 24,37	> 23,23	> 21,38	> 19,65	

oligo abrazadera: oligo 5, seguimiento de amplificación: oligo 3-2					
M/(M+W) (%)	1%	0,5%	0,1%	0,05%	0%
Valor Ct	34,30	34,94	36,09	36,45	37,26
Valor ΔCt (0%-X%)	2,96	2,32	1,17	0,81	

5

oligo abrazadera: oligo 5, seguimiento de amplificación: oligo 14					
M/(M+W) (%)	1%	0,5%	0,1%	0,05%	0%
Valor Ct	33,64	34,80	36,63	39,97	> 55
Valor ΔCt (0%-X%)	> 21,36	> 20,20	> 18,37	> 15,03	

oligo abrazadera: oligo 6, seguimiento de amplificación: oligo 3-2					
M/(M+W) (%)	1%	0,5%	0,1%	0,05%	0%
Valor Ct	39,09	39,51	40,65	39,94	41,42
Valor ΔCt (0%-X%)	2,33	1,91	0,77	1,48	

oligo abrazadera: oligo 6, seguimiento de amplificación: oligo 14					
M/(M+W) (%)	1%	0,5%	0,1%	0,05%	0%
Valor Ct	38,21	39,10	> 55	> 55	> 55
Valor ΔCt (0%-X%)	> 16,79	> 15,90	-	-	

Ejemplo 6

10 Detección de la mutación de eliminación del exón19 del gen EGFR por el método de abrazadera de BNA

(1) Muestra de ensayo

15 Como muestras de genes del tipo de natural y de tipo mutación por eliminación E746-A750 del (Tipo 1) del gen EGFR, se usaron los correspondientes ADN genómicos humanos disponibles en el mercado. La cantidad de cada ADN se determinó a partir del espectro UV de cada muestra y el valor de Ct obtenido por PCR en tiempo real usando oligo 22, 23 y 24 como cebador directo, cebador inverso y sonda de amplificación de ácido nucleico. Basándose en su cantidad de ADN, se produjeron muestras de ensayo modelo que tenían un tipo de mutación por eliminación del 100%, 10%, 1,0%, 0,1%, 0,01% o 0%, y se usaron las respectivas muestras de ensayo modelo en una cantidad de 50 ng por cada experimento.

(2) Aparato de amplificación de ácido nucleico y reactivo para la amplificación de ácido nucleico

20 Se usó StepOnePlus (fabricado por ABI) como un aparato de PCR en tiempo real y se usó TaqMan™ Fast Advanced Master Mix (fabricado por ABI) como los reactivos para la amplificación de ácido nucleico. La cantidad de reactivo a usar estaba de acuerdo con el manual adjunto.

(3) Cebador, sonda de amplificación de ácido nucleico, ácido nucleico abrazadera y sonda de detección de mutaciones

25 Se usaron oligo 22 y oligo 23 (cada uno 10 pmol) por experimento como cebadores directo e inverso, y se usó oligo 24 (2,5 pmol) por experimento como una sonda de amplificación de ácido nucleico. Como ácido nucleico abrazadera, se usó oligo 25 con 10 pmol por experimento, y se usó oligo 26 con 5 pmol por experimento como una sonda de detección de mutación para reconocer y detectar selectivamente el tipo de mutación por eliminación.

(4) Operación y resultados de la amplificación de ácidos nucleicos.

30 Una mezcla de los (1) - (3) mencionados antes de las muestras de prueba, reactivo para la amplificación de ácido nucleico, cebador, sonda para la amplificación de ácido nucleico, ácido nucleico abrazadera y sonda para la

detección de mutaciones, se sometió a (i) 50°C durante 2 min, (ii) 95°C durante 20 s, (iii) 95°C durante 10 s, (iv) 53°C durante 60 s, después de lo cual (v) se repitieron las operaciones de (iii) - (iv) 45-55 veces en un aparato de amplificación de ácido nucleico.

5 Las curvas de amplificación de ácidos nucleicos que siguen la amplificación de ácido nucleico (hasta 55 ciclos) que usan una sonda de amplificación de ácido nucleico (oligo 24) y cada sonda (oligo 26) para la detección de mutación en cada muestra de ensayo se muestran en la fig. 24. Además, los datos de valores de Ct en este experimento se muestran colectivamente en la tabla 8.

10 Para comparar el efecto del oligo abrazadera de BNA, además, se usaron oligo 27 (LNA), oligo 28 (PNA) y oligo 29 (ADN) para cada oligo abrazadera en lugar de oligo 25 y el ensayo se realizó en las mismas condiciones (no se usó oligo 26 como una sonda de detección de mutación), y el proceso de amplificación de ácido nucleico se siguió mediante oligo 24 (fig. 25 y tabla 9).

15 Estos datos han aclarado que, incluso cuando la mutación por eliminación del gen EGFR es la diana, un método de amplificación de ácido nucleico que usa el presente método de abrazadera de BNA y una sonda de detección de mutación en combinación, puede detectar y analizar la presencia o ausencia de la mutación y el modo de mutación con alta sensibilidad (no menos de 0,1%). Además, se aclaró que el oligo BNA como un oligo abrazadera era más altamente funcional que otros materiales oligo (LNA, PNA, etc.).

Tabla 8

Datos de valores de Ct (1) dirigidos a la mutación E746-A750 del (Tipo 1) del gen EGFR en el ejemplo 6

oligo abrazadera: oligo 25 + sonda de detección de mutación: oligo 26, seguimiento de amplificación: oligo 24						
M/(M+W) (%)	100%	10%	1%	0,1%	0,01%	0%
Valor Ct	26,17	29,92	33,05	37,66	39,96	44,81
Valor ΔCt (0%-X%)	18,63	14,89	11,76	7,15	4,85	

oligo abrazadera: oligo 25 + sonda de detección de mutación: oligo 26, seguimiento de amplificación: oligo 26						
M/(M+W) (%)	100%	10%	1%	0,1%	0,01%	0%
Valor Ct	25,27	29,09	32,33	36,79	39,14	> 55
Valor ΔCt (0%-X%)	> 29,73	> 25,91	> 22,67	> 18,21	> 15,86	

20

Tabla 9

Datos de valores de Ct (2) dirigidos a la mutación E746-A750 del (Tipo 1) del gen EGFR en el ejemplo 6

abrazadera oligo (BNA): oligo 25, seguimiento de amplificación: oligo 24						
M/(M+W) (%)	100%	10%	1%	0,1%	0,01%	0%
Valor Ct	25,33	28,77	32,35	34,82	> 55	> 55
Valor ΔCt (0%-X%)	> 29,67	> 26,23	> 22,65	> 20,18	-	

abrazadera oligo (LNA): oligo 27, seguimiento de amplificación: oligo 24						
M/(M+W) (%)	100%	10%	1%	0,1%	0,01%	0%
Valor Ct	25,34	28,79	32,09	34,84	36,15	35,86
Valor ΔCt (0%-X%)	10,52	7,08	3,77	1,02	-0,29	

abrazadera oligo (PNA): oligo 28, seguimiento de amplificación: oligo 24						
M/(M+W) (%)	100%	10%	1%	0,1%	0,01%	0%
Valor Ct	25,04	24,91	24,75	25,04	24,69	24,77
Valor ΔCt (0%-X%)	-0,27	-0,14	0,02	-0,27	0,08	

25

abrazadera oligo (ADN): oligo 29, seguimiento de amplificación: oligo 24						
M/(M+W) (%)	100%	10%	1%	0,1%	0,01%	0%
Valor Ct	24,98	24,56	24,49	24,25	24,41	24,25
Valor ΔCt (0%-X%)	-0,73	-0,31	-0,24	0,00	-0,16	

Aplicabilidad industrial

30 La presente invención que se refiere a una técnica de abrazadera de BNA, proporciona un método de ensayo que no se limita a una técnica para detectar una "mutación específica de un gen particular" en una "muestra de ensayo modelo" que tiene una relación de presencia aclarada de un gen de tipo mutación con alta sensibilidad y alta precisión, sino que es capaz de (1) usar varias muestras de ADN de genes obtenidas de varias formas de muestra

de ensayo (tejido biológico, sección de tejido introducido en parafina-fijado con formalina, fluido corporal, etc.) mediante una operación de aislamiento adecuada, como muestra de ensayo, y (2) detectar la presencia o ausencia de varios genes de tipo mutación contenidos en una cantidad en trazas en un gen de tipo natural con alta sensibilidad y alta precisión y de forma conveniente.

5 Además, el uso de una técnica de abrazadera de BNA y una sonda de detección de mutación en combinación permite la mejora adicional de la precisión de la sensibilidad de detección, que a su vez proporciona una técnica básica capaz de especificar y analizar no solo la presencia o ausencia de un gen de tipo mutación, sino también especificar y analizar la forma del tipo de mutación, y satisfacer diversas necesidades industriales.

10 Esta solicitud se basa en una solicitud de patente N° 2012-217657 presentada en Japón el 28 de septiembre de 2012.

Listado de secuencias

<110> BNA Inc.

<120> Método de abrazadera de BNA

<130> 092081

15 <150> JP 2012-217657
<151> 2012-09-28

<160> 35

<170> PatentIn version 3.3

<210> 1

20 <211> 134

<212> ADN

<213> Homo sapiens

<220>

<221> CDS

25 <222> (18)..(128)

<400> 1

```
tataaggcct gctgaaa atg act gaa tat aaa ctt gtg gta gtt gga gct      50
                Met Thr Glu Tyr Lys Leu Val Val Val Gly Ala
                  1                5                10
```

```
ggt ggc gta ggc aag agt gcc ttg acg ata cag cta att cag aat cat      98
Gly Gly Val Gly Lys Ser Ala Leu Thr Ile Gln Leu Ile Gln Asn His
                  15                20                25
```

```
ttt gtg gac gaa tat gat cca aca ata gag gtaaat      134
Phe Val Asp Glu Tyr Asp Pro Thr Ile Glu
                  30                35
```

<210> 2

<211> 37

30 <212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 2

```
Met Thr Glu Tyr Lys Leu Val Val Val Gly Ala Gly Gly Val Gly Lys
 1                5                10                15
```

```
Ser Ala Leu Thr Ile Gln Leu Ile Gln Asn His Phe Val Asp Glu Tyr
                20                25                30
```

```
Asp Pro Thr Ile Glu
 35
```

<210> 3

35 <211> 22

<212> ADN

<213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> Cebador directo
 <400> 3
 5 actgaatata aactgtggt ag 22
 <210> 4
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 10 <220>
 <223> Cebador inverso
 <400> 4
 attgttgat catattcgtc 20
 <210> 5
 15 <211> 28
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> Sonda
 20 <220>
 <221> caract_misc
 <222> (1)..(1)
 <223> Citosina modificada con FAM
 <220>
 25 <221> caract_misc
 <222> (28)..(28)
 <223> Timina modificada con TAMRA
 <400> 5
 nttgacgata cagctaattc agaatcan 28
 30 <210> 6
 <211> 28
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 35 <223> Sonda
 <220>
 <221> caract_misc
 <222> (1)..(1)
 <223> Citosina modificada con JOE
 40 <220>
 <221> caract_misc
 <222> (28)..(28)
 <223> Timina modificada con TAMRA
 <400> 6
 45 nttgacgata cagctaattc agaatcan 28
 <210> 7
 <211> 10
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 50 <220>
 <223> Abrazadera de BNA

- <220>
 <221> caract_misc
 <222> (1)..(1)
 <223> 2',4'-BNANC(N-Me)-metilcitosina
- 5 <220>
 <221> caract_misc
 <222> (3)..(4)
 <223> 2',4'-BNANC(N-Me)-metilcitosina
- 10 <220>
 <221> caract_misc
 <222> (5)..(5)
 <223> 2',4'-BNANC(N-Me)-adenina
- 15 <220>
 <221> caract_misc
 <222> (6)..(7)
 <223> 2',4'-BNANC(N-Me)-metilcitosina
- 20 <220>
 <221> caract_misc
 <222> (8)..(8)
 <223> 2',4'-BNANC(N-Me)-adenina
- <220>
 <221> caract_misc
 <222> (10)..(10)
 <223> 2',4'-BNANC(N-Me)-metilcitosina monofosforilada
- 25 <400> 7
 ngnnnnnngn 10
- <210> 8
 <211> 13
 <212> ADN
 30 <213> Secuencia Artificial
- <220>
 <223> Abrazadera de BNA
- 35 <220>
 <221> caract_misc
 <222> (1)..(1)
 <223> 2'-OMe-ARN-uracilo
- 40 <220>
 <221> caract_misc
 <222> (1)..(13)
 <223> ADN/ARN híbrido
- <220>
 <221> caract_misc
 <222> (3)..(3)
 <223> 2',4'-BNANC(N-Me)-metilcitosina
- 45 <220>
 <221> caract_misc
 <222> (5)..(6)
 <223> 2',4'-BNANC(N-Me)-metilcitosina
- 50 <220>
 <221> caract_misc
 <222> (7)..(7)
 <223> 2',4'-BNANC(N-Me)-adenina
- <220>
 <221> caract_misc

<222> (8)..(9)
 <223> 2',4'-BNANC(N-Me)-metilcitosina

 <220>
 <221> caract_misc
 5 <222> (10)..(10)
 <223> 2',4'-BNANC(N-Me)-adenina

 <220>
 <221> caract_misc
 10 <222> (12)..(12)
 <223> 2',4'-BNANC(N-Me)-metilcitosina

 <220>
 <221> caract_misc
 <222> (13)..(13)
 <223> timina monofosforilada

 15 <400> 8
 nangnnnnnn gnn 13

 <210> 9
 <211> 18
 <212> ADN
 20 <213> Secuencia Artificial

 <220>
 <223> Abrazadera de BNA

 <220>
 <221> caract_misc
 25 <222> (1)..(1)
 <223> 2'-OMe-ARN-guanina

 <220>
 <221> caract_misc
 <222> (1)..(18)
 30 <223> ADN/ARN hibrido

 <220>
 <221> caract_misc
 <222> (4)..(4)
 <223> 2',4'-BNANC(N-Me)-timina

 35 <220>
 <221> caract_misc
 <222> (6)..(6)
 <223> 2',4'-BNANC(N-Me)-metilcitosina

 <220>
 <221> caract_misc
 <222> (8)..(9)
 40 <223> 2',4'-BNANC(N-Me)-metilcitosina

 <220>
 <221> caract_misc
 <222> (11)..(12)
 45 <223> 2',4'-BNANC(N-Me)-metilcitosina

 <220>
 <221> caract_misc
 <222> (15)..(15)
 50 <223> 2',4'-BNANC(N-Me)-metilcitosina

 <220>
 <221> caract_misc
 <222> (18)..(18)
 <223> citosina monofosforilada

<400> 9
 nccnangnna nnagntcn 18

 <210> 10
 <211> 10
 5 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

 <220>
 <223> LNA clamp

 10 <220>
 <221> caract_misc
 <222> (1)..(1)
 <223> LNA-metilcitosina

 15 <220>
 <221> caract_misc
 <222> (3)..(4)
 <223> LNA-metilcitosina

 20 <220>
 <221> caract_misc
 <222> (5)..(5)
 <223> LNA-adenina

 <220>
 <221> caract_misc
 <222> (6)..(7)
 <223> LNA-metilcitosina

 25 <220>
 <221> caract_misc
 <222> (8)..(8)
 <223> LNA-adenina

 30 <220>
 <221> caract_misc
 <222> (10)..(10)
 <223> LNA-metilcitosina monofosforilada

 <400> 10
 ngnnnnnngn 10

 35 <210> 11
 <211> 13
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

 40 <220>
 <223> Abrazadera de ADN

 <220>
 <221> caract_misc
 <222> (1)..(1)
 <223> 2'-OMe-ARN-uracilo

 45 <220>
 <221> caract_misc
 <222> (1)..(13)
 <223> ADN/ARN híbrido

 50 <220>
 <221> caract_misc
 <222> (13)..(13)
 <223> timina monofosforilada

 <400> 11
 nacgccacca gcn 13

<210> 12
 <211> 13
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

5 <220>
 <223> Abrazadera de LNA

<220>
 <221> caract_misc
 <222> (1)..(1)

10 <223> 2'-OMe-ARN-uracilo

<220>
 <221> caract_misc
 <222> (1)..(13)
 <223> ADN/ARN híbrido

15 <220>
 <221> caract_misc
 <222> (3)..(3)
 <223> LNA-metilcitosina

<220>
 <221> caract_misc
 <222> (5)..(6)
 <223> LNA-metilcitosina

20

<220>
 <221> caract_misc
 <222> (7)..(7)
 <223> LNA-adenina

25

<220>
 <221> caract_misc
 <222> (8)..(9)
 <223> LNA-metilcitosina

30

<220>
 <221> caract_misc
 <222> (10)..(10)
 <223> LNA-adenina

35

<220>
 <221> caract_misc
 <222> (12)..(12)
 <223> LNA-metilcitosina

40

<220>
 <221> caract_misc
 <222> (13)..(13)
 <223> timina monofosforilada

<400> 12
 nangnnnnnn gnn 13

45 <210> 13
 <211> 13
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

<220>
 <223> Abrazadera de PNA

50

<220>
 <221> caract_misc
 <222> (1)..(1)
 <223> PNA-timina

<220>
 <221> caract_misc
 <222> (2)..(2)
 <223> PNA-adenina

5 <220>
 <221> caract_misc
 <222> (3)..(3)
 <223> PNA-citosina

10 <220>
 <221> caract_misc
 <222> (4)..(4)
 <223> PNA-guanina

15 <220>
 <221> caract_misc
 <222> (5)..(6)
 <223> PNA-citosina

20 <220>
 <221> caract_misc
 <222> (7)..(7)
 <223> PNA-adenina

 <220>
 <221> caract_misc
 <222> (8)..(9)
 <223> PNA-citosina

25 <220>
 <221> caract_misc
 <222> (10)..(10)
 <223> PNA-adenina

30 <220>
 <221> caract_misc
 <222> (11)..(11)
 <223> PNA-guanina

35 <220>
 <221> caract_misc
 <222> (12)..(12)
 <223> PNA-citosina

40 <220>
 <221> caract_misc
 <222> (13)..(13)
 <223> PNA-timina

 <400> 13
 nnnnnnnnnn nnn 13

45 <210> 14
 <211> 18
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

 <220>
 <223> Abrazadera de ADN

50 <220>
 <221> caract_misc
 <222> (1)..(1)
 <223> 2'-OMe-ARN-guanina

 <220>
 <221> caract_misc

<222> (1)..(18)
 <223> ADN/ARN híbrido

 <220>
 <221> caract_misc
 5 <222> (18)..(18)
 <223> citosina monofosforilada

 <400> 14
 ncctacgccca ccagctcn 18

 <210> 15
 10 <211> 18
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

 <220>
 <223> Abrazadera de LNA

 15 <220>
 <221> caract_misc
 <222> (1)..(1)
 <223> 2'-OMe-ARN-guanina

 <220>
 20 <221> caract_misc
 <222> (1)..(18)
 <223> ADN/ARN híbrido

 <220>
 25 <221> caract_misc
 <222> (4)..(4)
 <223> LNA-timina

 <220>
 30 <221> caract_misc
 <222> (6)..(6)
 <223> LNA-citosina

 <220>
 <221> caract_misc
 <222> (8)..(9)
 <223> LNA-citosina

 35 <220>
 <221> caract_misc
 <222> (11)..(12)
 <223> LNA-citosina

 <220>
 40 <221> caract_misc
 <222> (15)..(15)
 <223> LNA-citosina

 <220>
 45 <221> caract_misc
 <222> (18)..(18)
 <223> citosina monofosforilada

 <400> 15
 nccnangnna nnagntc 18

 <210> 16
 50 <211> 18
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

 <220>
 <223> Abrazadera de PNA

<220>
 <221> caract_misc
 <222> (1)..(1)
 <223> PNA-guanina

5 <220>
 <221> caract_misc
 <222> (2)..(3)
 <223> PNA-citosina

10 <220>
 <221> caract_misc
 <222> (4)..(4)
 <223> PNA-timina

15 <220>
 <221> caract_misc
 <222> (5)..(5)
 <223> PNA-adenina

20 <220>
 <221> caract_misc
 <222> (6)..(6)
 <223> PNA-citosina

 <220>
 <221> caract_misc
 <222> (7)..(7)
 <223> PNA-guanina

25 <220>
 <221> caract_misc
 <222> (8)..(9)
 <223> PNA-citosina

30 <220>
 <221> caract_misc
 <222> (10)..(10)
 <223> PNA-adenina

35 <220>
 <221> caract_misc
 <222> (11)..(12)
 <223> PNA-citosina

40 <220>
 <221> caract_misc
 <222> (13)..(13)
 <223> PNA-adenina

 <220>
 <221> caract_misc
 <222> (14)..(14)
 <223> PNA-guanina

45 <220>
 <221> caract_misc
 <222> (15)..(15)
 <223> PNA-citosina

50 <220>
 <221> caract_misc
 <222> (16)..(16)
 <223> PNA-timina

55 <220>
 <221> caract_misc
 <222> (17)..(18)

<223> PNA-citosina

<400> 16
 nnnnnnnnnn nnnnnnnn 18

5 <210> 17
 <211> 15
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

<220>
 <223> Sonda de detección

10 <220>
 <221> caract_misc
 <222> (1)..(1)
 <223> Timina modificada con FAM

15 <220>
 <221> caract_misc
 <222> (15)..(15)
 <223> Citosina modificada con TAMRA

<400> 17
 nacgccaaca gctcn 15

20 <210> 18
 <211> 15
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

25 <220>
 <223> Sonda de detección

<220>
 <221> caract_misc
 <222> (1)..(1)
 <223> Timina modificada con FAM

30 <220>
 <221> caract_misc
 <222> (8)..(8)
 <223> 2',4'-BNANC(N-Me)-adenina

35 <220>
 <221> caract_misc
 <222> (15)..(15)
 <223> Citosina modificada con TAMRA

<400> 18
 nacgccanca gctcn 15

40 <210> 19
 <211> 10
 <212> ADN
 <213> Artificial

45 <220>
 <223> Abrazadera de BNA

<220>
 <221> caract_misc
 <222> (1)..(1)
 <223> 2',4'-BNANC(N-Me)-metilcitosina

50 <220>
 <221> caract_misc
 <222> (2)..(2)
 <223> 2',4'-BNANC(N-Me)-guanina

<220>
 <221> caract_misc
 <222> (3)..(4)
 <223> 2',4'-BNANC(N-Me)-metilcitosina

5

<220>
 <221> caract_misc
 <222> (5)..(5)
 <223> 2',4'-BNANC(N-Me)-adenina

10

<220>
 <221> caract_misc
 <222> (6)..(7)
 <223> 2',4'-BNANC(N-Me)-metilcitosina

15

<220>
 <221> caract_misc
 <222> (8)..(8)
 <223> 2',4'-BNANC(N-Me)-adenina

20

<220>
 <221> caract_misc
 <222> (9)..(9)
 <223> 2',4'-BNANC(N-Me)-guanina

25

<220>
 <221> caract_misc
 <222> (10)..(10)
 <223> 2',4'-BNANC(N-Me)-metilcitosina monofosforilada

<400> 19
 nnnnnnnnnn 10

30

<210> 20
 <211> 10
 <212> ADN
 <213> Artificial

<220>
 <223> Sonda de detección

35

<220>
 <221> caract_misc
 <222> (1)..(1)
 <223> Citosina modificada con FAM

40

<220>
 <221> caract_misc
 <222> (10)..(10)
 <223> Citosina modificada con TAMRA

<400> 20
 naacagctcn 10

45

<210> 21
 <211> 10
 <212> ADN
 <213> Artificial

<220>
 <223> Sonda de detección BNA

50

<220>
 <221> caract_misc
 <222> (1)..(1)
 <223> Citosina modificada con FAM

<220>
 <221> caract_misc

<222> (3)..(3)
 <223> 2',4'-BNANC(N-Me)-adenina

 <220>
 <221> caract_misc
 5 <222> (5)..(5)
 <223> 2',4'-BNANC(N-Me)-adenina

 <220>
 <221> caract_misc
 10 <222> (7)..(7)
 <223> 2',4'-BNANC(N-Me)-metilcitosina

 <220>
 <221> caract_misc
 <222> (9)..(9)
 <223> 2',4'-BNANC(N-Me)-metilcitosina

 15 <220>
 <221> caract_misc
 <222> (10)..(10)
 <223> Citosina modificada con TAMRA

 20 <400> 21
 nancngntnn 10

 <210> 22
 <211> 15
 <212> ADN
 <213> Artificial

 25 <220>
 <223> Sonda de detección

 <220>
 <221> caract_misc
 30 <222> (1)..(1)
 <223> Timina modificada con FAM

 <220>
 <221> caract_misc
 <222> (15)..(15)
 <223> Citosina modificada con TAMRA

 35 <400> 22
 nacgcatca gctcn 15

 <210> 23
 <211> 15
 <212> ADN
 40 <213> Artificial

 <220>
 <223> Sonda de detección

 <220>
 <221> caract_misc
 45 <222> (1)..(1)
 <223> Timina modificada con FAM

 <220>
 <221> caract_misc
 <222> (15)..(15)
 50 <223> Citosina modificada con TAMRA

 <400> 23
 nacgtcacca gctcn 15

 <210> 24

<211> 15
 <212> ADN
 <213> Artificial

 <220>
 5 <223> Sonda de detección

 <220>
 <221> caract_misc
 <222> (1)..(1)
 <223> Timina modificada con FAM

 10 <220>
 <221> caract_misc
 <222> (15)..(15)
 <223> Citosina modificada con TAMRA

 <400> 24
 15 nacgccagca gctcn 15

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

 20 <220>
 <223> Sonda de detección

 <220>
 <221> caract_misc
 <222> (1)..(1)
 25 <223> Timina modificada con FAM

 <220>
 <221> caract_misc
 <222> (15)..(15)
 <223> Citosina modificada con TAMRA

 30 <400> 25
 nacgccacaa gctcn 15

 <210> 26
 <211> 15
 <212> ADN
 35 <213> Artificial

 <220>
 <223> Sonda de detección

 <220>
 <221> caract_misc
 <222> (1)..(1)
 40 <223> Timina modificada con FAM

 <220>
 <221> caract_misc
 <222> (15)..(15)
 45 <223> Citosina modificada con TAMRA

 <400> 26
 nacgccacta gctcn 15

 <210> 27
 <211> 15
 50 <212> ADN
 <213> Artificial

 <220>
 <223> Sonda de detección

<220>
 <221> caract_misc
 <222> (1)..(1)
 <223> Timina modificada con FAM

5

<220>
 <221> caract_misc
 <222> (15)..(15)
 <223> Citosina modificada con TAMRA

10

<400> 27
 nacgccacga gctcn 15

<210> 28
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Artificial

15

<220>
 <223> Cebador directo

<400> 28
 tggcaccatc tcacaattgc 20

20

<210> 29
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Artificial

<220>
 <223> Cebador inverso

25

<400> 29
 acacagcaaa gcagaaactc 20

<210> 30
 <211> 26
 <212> ADN

30

<213> Artificial

<220>
 <223> Sonda

<220>
 <221> caract_misc
 <222> (1)..(1)
 <223> Citosina modificada con JOE

35

<220>
 <221> caract_misc
 <222> (26)..(26)
 <223> Adenina modificada con TAMRA

40

<400> 30
 ncgaaagcca acaaggaaat cctcgn 26

<210> 31
 <211> 18
 <212> ADN

45

<213> Artificial

<220>
 <223> Abrazadera de BNA

<220>
 <221> caract_misc
 <222> (1)..(1)
 <223> 2'-OMe-ARN-guanina

50

- <220>
 <221> caract_misc
 <222> (1)..(18)
 <223> ADN/ARN híbrido
- 5 <220>
 <221> caract_misc
 <222> (2)..(3)
 <223> 2',4'-BNANC(N-H)-timina
- 10 <220>
 <221> caract_misc
 <222> (6)..(7)
 <223> 2',4'-BNANC(N-H)-timina
- 15 <220>
 <221> caract_misc
 <222> (8)..(8)
 <223> 2',4'-BNANC(N-H)-metilcitosina
- 20 <220>
 <221> caract_misc
 <222> (9)..(9)
 <223> 2',4'-BNANC(N-H)-timina
- <220>
 <221> caract_misc
 <222> (10)..(10)
 <223> 2',4'-BNANC(N-H)-metilcitosina
- 25 <220>
 <221> caract_misc
 <222> (11)..(11)
 <223> 2',4'-BNANC(N-H)-timina
- 30 <220>
 <221> caract_misc
 <222> (16)..(16)
 <223> 2',4'-BNANC(N-H)-timina
- 35 <220>
 <221> caract_misc
 <222> (18)..(18)
 <223> 2',4'-BNANC(N-H)-metilcitosina monofosforilada
- <400> 31
 nnngcnnnnn ntaatncn 18
- 40 <210> 32
 <211> 22
 <212> ADN
 <213> Artificial
- <220>
 <223> Sonda de detección
- 45 <220>
 <221> caract_misc
 <222> (1)..(1)
 <223> Timina modificada con FAM
- 50 <220>
 <221> caract_misc
 <222> (22)..(22)
 <223> Timina modificada con TAMRA
- <400> 32
 ncccgtcgct atcaaaacat cn 22

- <210> 33
 <211> 18
 <212> ADN
 <213> Artificial
- 5 <220>
 <223> Abrazadera de LNA
- <220>
 <221> caract_misc
 <222> (1)..(1)
- 10 <223> 2'-OMe-ARN-guanina
- <220>
 <221> caract_misc
 <222> (1)..(18)
 <223> ADN/ARN híbrido
- 15 <220>
 <221> caract_misc
 <222> (2)..(3)
 <223> LNA-timina
- 20 <220>
 <221> caract_misc
 <222> (6)..(7)
 <223> LNA-timina
- 25 <220>
 <221> caract_misc
 <222> (8)..(8)
 <223> LNA-metilcitosina
- 30 <220>
 <221> caract_misc
 <222> (9)..(9)
 <223> LNA-timina
- <220>
 <221> caract_misc
 <222> (10)..(10)
 <223> LNA-metilcitosina
- 35 <220>
 <221> caract_misc
 <222> (11)..(11)
 <223> LNA-timina
- 40 <220>
 <221> caract_misc
 <222> (16)..(16)
 <223> LNA-timina
- 45 <220>
 <221> caract_misc
 <222> (18)..(18)
 <223> monofosforilada LNA-metilcitosina
- <400> 33
 nnnngcnnnnn ntaatncn 18
- 50 <210> 34
 <211> 18
 <212> ADN
 <213> Artificial
- <220>
 <223> Abrazadera de PNA

<220>
 <221> caract_misc
 <222> (1)..(1)
 <223> PNA-guanina

5 <220>
 <221> caract_misc
 <222> (2)..(3)
 <223> PNA-timina

10 <220>
 <221> caract_misc
 <222> (4)..(4)
 <223> PNA-guanina

15 <220>
 <221> caract_misc
 <222> (5)..(5)
 <223> PNA-citosina

20 <220>
 <221> caract_misc
 <222> (6)..(7)
 <223> PNA-timina

 <220>
 <221> caract_misc
 <222> (8)..(8)
 <223> PNA-citosina

25 <220>
 <221> caract_misc
 <222> (9)..(9)
 <223> PNA-timina

30 <220>
 <221> caract_misc
 <222> (10)..(10)
 <223> PNA-citosina

35 <220>
 <221> caract_misc
 <222> (11)..(12)
 <223> PNA-timina

40 <220>
 <221> caract_misc
 <222> (13)..(14)
 <223> PNA-adenina

 <220>
 <221> caract_misc
 <222> (15)..(16)
 <223> PNA-timina

45 <220>
 <221> caract_misc
 <222> (17)..(18)
 <223> PNA-citosina

50 <400> 34
 nnnnnnnnnn nnnnnnnn 18

 <210> 35
 <211> 18
 <212> ADN
 <213> Artificial

<220>
<223> Abrazadera de ADN

<220>
<221> caract_misc
5 <222> (1)..(1)
<223> 2'-OMe-ARN-guanina

<220>
<221> caract_misc
10 <222> (1)..(18)
<223> ADN/ARN híbrido

<220>
<221> caract_misc
<222> (18)..(18)
<223> citosina monofosforilada

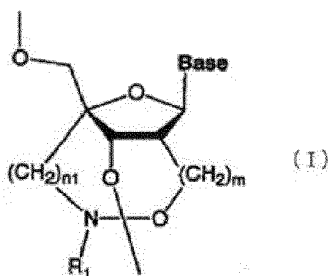
15 <400> 35
nttgctctc ttaattcn 18

REIVINDICACIONES

1. Un método para detectar un ácido nucleico diana que tiene una diferencia en una secuencia de bases en un sitio diana de detección en el ácido nucleico diana en una muestra de ensayo, en donde el ácido nucleico diana comprende al menos una diferencia en la secuencia de bases respecto a un ácido nucleico no diana de detección, que comprende

5 una etapa de amplificación selectiva de una región que contiene al menos una parte del sitio diana de detección del ácido nucleico diana de detección en la muestra de ensayo por un método de amplificación de ácido nucleico que usa un ácido nucleico abrazadera que tiene una secuencia de bases complementaria a la secuencia de bases del sitio diana de detección en el ácido nucleico no diana de detección, y

10 una etapa para detectar el ácido nucleico amplificado, en donde el ácido nucleico abrazadera es un análogo de oligonucleótido que contiene una o más de una estructura unitaria de análogos de nucleósidos representada por la siguiente fórmula (I):



en donde

15 Base es una base de ácido nucleico de pirimidina o purina que tiene opcionalmente uno o más sustituyentes,

R₁ es un átomo de hidrógeno, un grupo alquilo, un grupo alquenoilo, un grupo cicloalquilo, un grupo arilo, un grupo aralquilo, un grupo acilo, un grupo sulfonilo, un grupo sililo, o un sustituyente de unidad de molécula funcional,

m es un número entero de 0 - 2, y

n₁ es un número entero de 1 - 3,

20 con la condición de que una forma de unión entre los análogos de nucleósidos respectivos en los análogos de oligonucleótidos contenga opcionalmente uno o más enlaces fosforotioato además de un enlace fosfodiéster y, cuando están contenidas dos o más de las estructuras unitarias mencionadas antes, la Base puede ser la misma o diferente entre las estructuras, o una de sus sales.

2. El método según la reivindicación 1, en donde el ácido nucleico abrazadera es un análogo de oligonucleótido que contiene una o más de una estructura unitaria de análogos de nucleósidos de la fórmula (I) mencionada antes, en donde

30 Base es una base de ácido nucleico de pirimidina o purina que tiene opcionalmente uno o más sustituyentes seleccionados del grupo que consiste en un grupo hidroxilo, un grupo hidroxilo protegido con un grupo protector para la síntesis de ácidos nucleicos, un grupo alcoxi que tiene de 1 a 5 átomos de carbono, un grupo mercapto, un grupo mercapto protegido con un grupo protector para la síntesis de ácidos nucleicos, un grupo alquiltio que tiene de 1 a 5 átomos de carbono, un grupo amino, un grupo amino protegido con un grupo protector para la síntesis de ácidos nucleicos, un grupo amino sustituido con un grupo alquilo que tiene de 1 a 5 átomos de carbono, un grupo alquilo que tiene de 1 a 5 átomos de carbono y un átomo de halógeno,

35 R₁ es un átomo de hidrógeno, un grupo alquilo que tiene de 1 a 5 átomos de carbono, un grupo bencilo, un grupo acetilo, un grupo benzoilo, un grupo metanosulfonilo o un grupo p-toluenosulfonilo,

m es un número entero de 0 - 2, y

n₁ es un número entero de 1 - 3,

o una de sus sales.

3. El método según la reivindicación 1 o 2, en donde el ácido nucleico abrazadera es un análogo de oligonucleótido que contiene una o más de una estructura unitaria de análogos de nucleósidos de la fórmula (I) mencionada antes, en donde

Base es una base de ácido nucleico de pirimidina o purina que tiene opcionalmente uno o más sustituyentes

5 seleccionados del grupo que consiste en un grupo hidroxilo, un grupo hidroxilo protegido con un grupo protector para la síntesis de ácidos nucleicos, un grupo alcoxi que tiene de 1 a 5 átomos de carbono, un grupo mercapto, un grupo mercapto protegido con un grupo protector para la síntesis de ácidos nucleicos, un grupo alquiltio que tiene de 1 a 5 átomos de carbono, un grupo amino, un grupo amino protegido con un grupo protector para la síntesis de ácidos nucleicos, un grupo amino sustituido con un grupo alquilo que tiene de 1 a 5 átomos de carbono, un grupo alquilo que tiene de 1 a 5 átomos de carbono y un átomo de halógeno,

R₁ es un grupo metilo,

m es 0, y

n₁ es 1,

10 o una de sus sales.

4. El método según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en donde el ácido nucleico abrazadera tiene una longitud de 5 - 30 unidades monómeras.

15 5. El método según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en donde el método de amplificación de ácido nucleico es un método de reacción en cadena de la polimerasa (PCR), opcionalmente un método de PCR en tiempo real.

20 6. El método según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, en donde el método de la PCR es un método de la PCR en tiempo real realizado usando una sonda de detección, y la sonda de detección es un ácido nucleico monocatenario que tiene una secuencia de bases complementaria a la secuencia de bases de la región donde se va a detectar una diferencia en una secuencia de bases en un sitio diana de detección, en donde un extremo está sustituido con un grupo de fluorescencia, el otro extremo está sustituido con un grupo de atenuación.

7. El método según la reivindicación 6, en donde la sonda de detección es un análogo de oligonucleótido que contiene una o más de uno de una estructura unitaria de análogos de nucleósidos de una cualquiera de la fórmula (I) mencionada antes, o una de sus sales.

8. El método según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, en donde:

25 (a) la diferencia en la secuencia de bases entre el ácido nucleico no diana de detección y el ácido nucleico diana de detección es causada por una o más mutaciones seleccionadas del grupo que consiste en sustitución, inserción, eliminación, inversión, superposición y translocación o una de sus combinaciones;

y/o

30 (b) la etapa de detección del ácido nucleico amplificado comprende la secuenciación de un producto de amplificación;

y/o

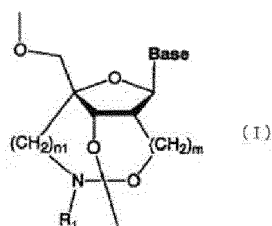
(c) el ácido nucleico diana es un gen, y la diferencia en la secuencia de bases del gen que es la diana de detección está relacionada con el inicio y/o sensibilidad al tratamiento de una enfermedad en particular.

35 9. Un kit para detectar un ácido nucleico diana que tiene una diferencia en una secuencia de bases en un sitio diana de detección en el ácido nucleico diana en una muestra de ensayo, en donde el ácido nucleico diana es un ácido nucleico diana de detección que tiene al menos una diferencia en una secuencia de bases respecto a un ácido nucleico no diana de detección, comprendiendo el kit

(a) un ácido nucleico abrazadera que tiene una secuencia de bases complementaria a la secuencia de bases del sitio diana de detección de un ácido nucleico no diana de detección, y

40 (b) un reactivo para amplificar selectivamente una región que contiene al menos una parte del sitio diana de detección del ácido nucleico diana de detección en la muestra de ensayo,

en donde el ácido nucleico abrazadera es un análogo de oligonucleótido que contiene una o más de una estructura unitaria de análogos de nucleósidos representados por la siguiente fórmula (I):



en donde

Base es una base de ácido nucleico pirimidínica o púrica que tiene opcionalmente uno o más sustituyentes,

5 R_1 es un átomo de hidrógeno, un grupo alquilo, un grupo alquenoilo, un grupo cicloalquilo, un grupo arilo, un grupo aralquilo, un grupo acilo, un grupo sulfonilo, un grupo sililo, o un sustituyente de unidad de molécula funcional,

m es un número entero de 0 - 2, y

n_1 es un número entero de 1 - 3,

10 con la condición de que una forma de unión entre los respectivos análogos de nucleósidos en los análogos de oligonucleótidos contenga opcionalmente uno o más enlaces fosforotioato además de un enlace fosfodiéster y, cuando están contenidas dos o más de las estructuras unitarias mencionadas antes, la Base puede ser la misma o diferente entre las estructuras, o una de sus sales.

10. El kit según la reivindicación 9, en donde el ácido nucleico abrazadera es un análogo de oligonucleótido que contiene una o más de una estructura unitaria de análogos de nucleósidos de la fórmula (I) mencionada antes, en donde

15 Base es una base de ácido nucleico pirimidínica o púrica que tiene opcionalmente uno o más sustituyentes seleccionados del grupo que consiste en un grupo hidroxilo, un grupo hidroxilo protegido con un grupo protector para la síntesis de ácidos nucleicos, un grupo alcoxi que tiene de 1 a 5 átomos de carbono, un grupo mercapto, un grupo mercapto protegido con un grupo protector para la síntesis de ácidos nucleicos, un grupo alquiltio que tiene de 1 a 5 átomos de carbono, un grupo amino, un grupo amino protegido con un grupo protector para la síntesis de ácidos nucleicos, un grupo amino sustituido con un grupo alquilo que tiene de 1 a 5 átomos de carbono, un grupo alquilo que tiene de 1 a 5 átomos de carbono y un átomo de halógeno,

R_1 es un átomo de hidrógeno, un grupo alquilo que tiene de 1 a 5 átomos de carbono, un grupo bencilo, un grupo acetilo, un grupo benzoilo, un grupo metanosulfonilo o un grupo p-toluenosulfonilo,

m es un número entero de 0 - 2, y

25 n_1 es un número entero de 1 - 3,

o una de sus sales.

11. El kit según la reivindicación 9 o 10, en donde el ácido nucleico abrazadera es un análogo de oligonucleótido que contiene una o más de una estructura unitaria de análogos de nucleósidos de la fórmula (I) mencionada antes, en donde

30 Base es una base de ácido nucleico pirimidínica o púrica que tiene opcionalmente uno o más sustituyentes seleccionados del grupo que consiste en un grupo hidroxilo, un grupo hidroxilo protegido con un grupo protector para la síntesis de ácidos nucleicos, un grupo alcoxi que tiene de 1 a 5 átomos de carbono, un grupo mercapto, un grupo mercapto protegido con un grupo protector para la síntesis de ácidos nucleicos, un grupo alquiltio que tiene de 1 a 5 átomos de carbono, un grupo amino, un grupo amino protegido con un grupo protector para la síntesis de ácidos nucleicos, un grupo amino sustituido con un grupo alquilo que tiene de 1 a 5 átomos de carbono, un grupo alquilo que tiene de 1 a 5 átomos de carbono y un átomo de halógeno,

R_1 es un grupo metilo,

m es 0, y

n_1 es 1,

40 o una de sus sales.

12. El kit según una cualquiera de las reivindicaciones 9 a 11, en donde el ácido nucleico abrazadera tiene una longitud de 5 - 30 unidades monómeras.

13. El kit según una cualquiera de las reivindicaciones 9 a 12, en donde el reactivo de (b) mencionado antes comprende un cebador de amplificación para la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), opcionalmente para una PCR en tiempo real.

5 14. El kit según la reivindicación 13, en donde el kit comprende además una sonda de detección, y la sonda de detección es un ácido nucleico monocatenario que tiene una secuencia de bases complementaria de la secuencia de bases de la región donde se va a detectar una diferencia en una secuencia de bases en un ácido nucleico diana de detección, en donde un extremo está sustituido con un grupo de fluorescencia, el otro extremo está sustituido con un grupo de atenuación, opcionalmente en donde la sonda de detección es un análogo de oligonucleótido que
10 contiene una o más de una estructura unitaria de análogos de nucleósidos de la fórmula (I) mencionada antes, o una de sus sales.

15. El kit según una cualquiera de las reivindicaciones 9 a 14, en donde:

(a) la diferencia en la secuencia de bases entre el ácido nucleico no diana de detección y el ácido nucleico diana de detección es causada por una o más mutaciones seleccionadas del grupo que consiste en sustitución, inserción, eliminación, inversión, superposición y translocación o una de sus combinaciones;

15 y/o

(b) el ácido nucleico diana es un gen, y la diferencia en la secuencia de bases del gen que es la diana de detección está relacionada con el inicio y/o sensibilidad al tratamiento de una enfermedad en particular.

Fig. 1

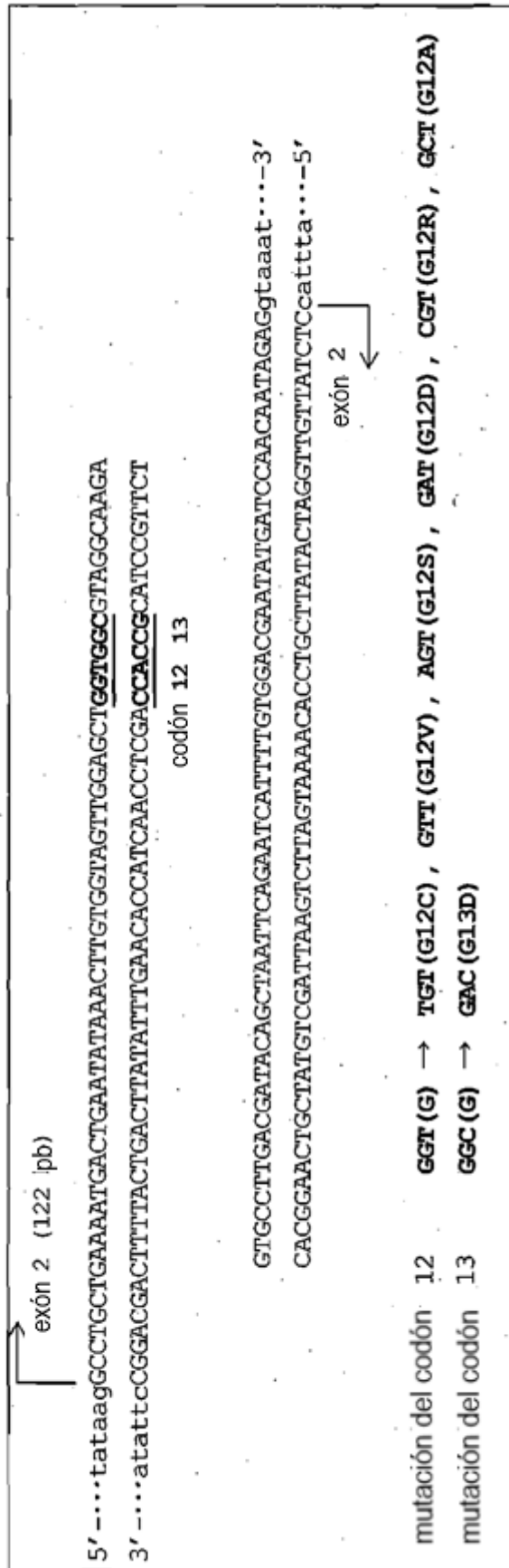
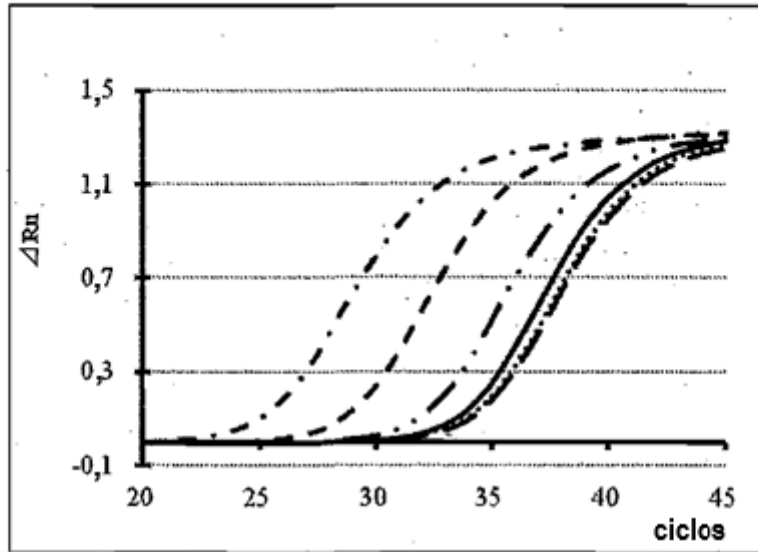
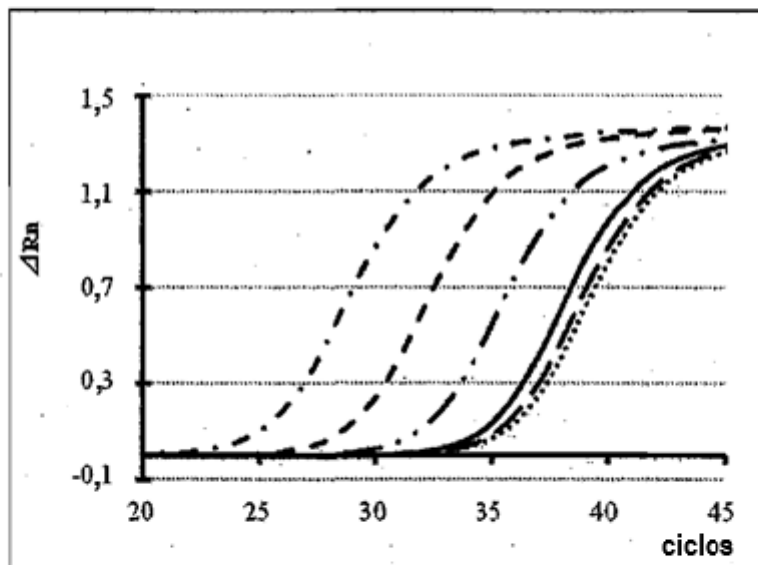


Fig. 2



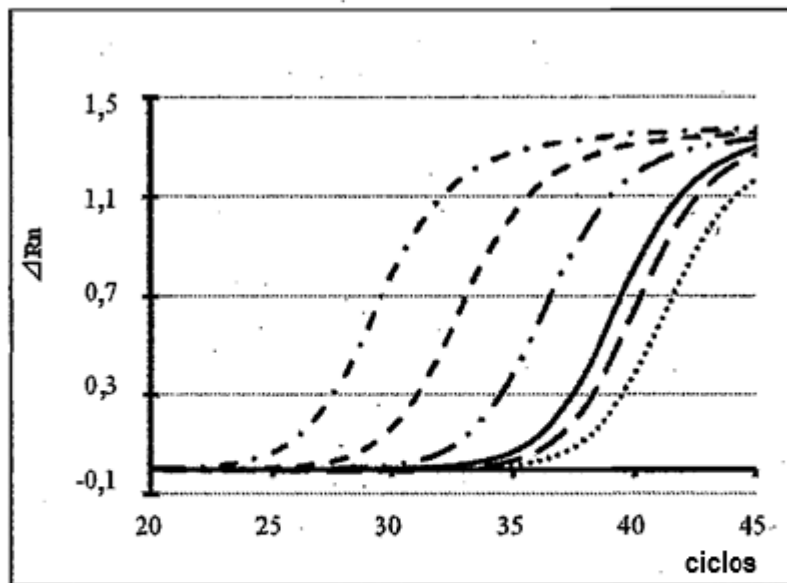
curva en la figura						
M/ (M+W) (%) en la muestra de ensayo	100	10	1	0,1	0,01	0

Fig. 3



curva en la figura						
M/ (M+W) (%) en la muestra de ensayo	100	10	1	0,1	0,01	0

Fig. 4



curva en la figura						
M/ (M+W) (%) en la muestra de ensayo	100	10	1	0,1	0,01	0

Fig. 5

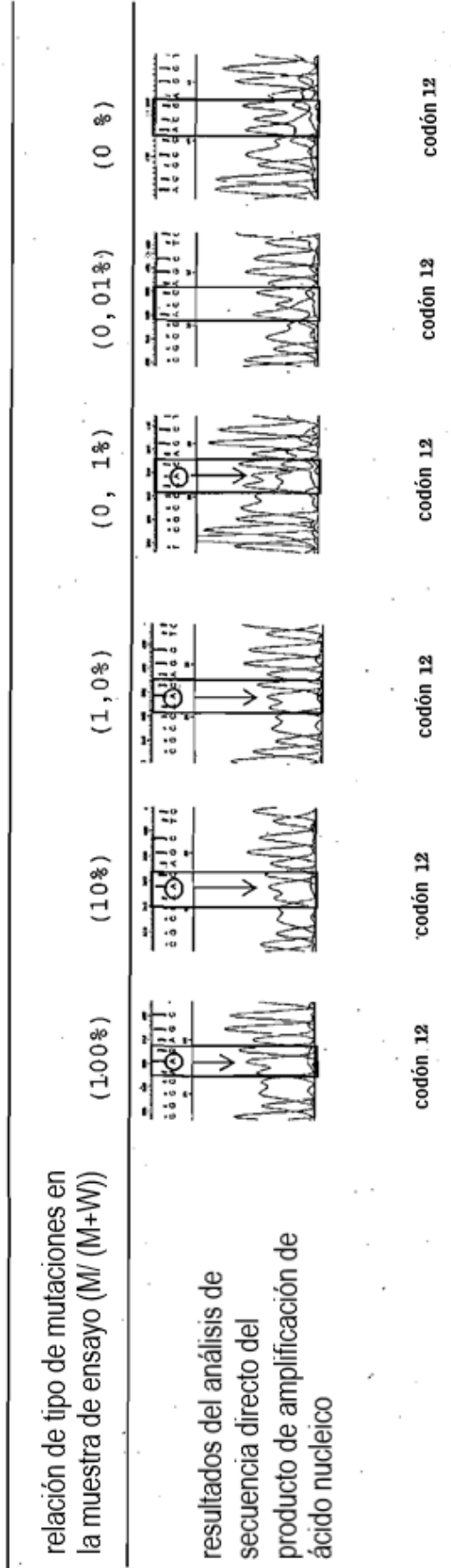
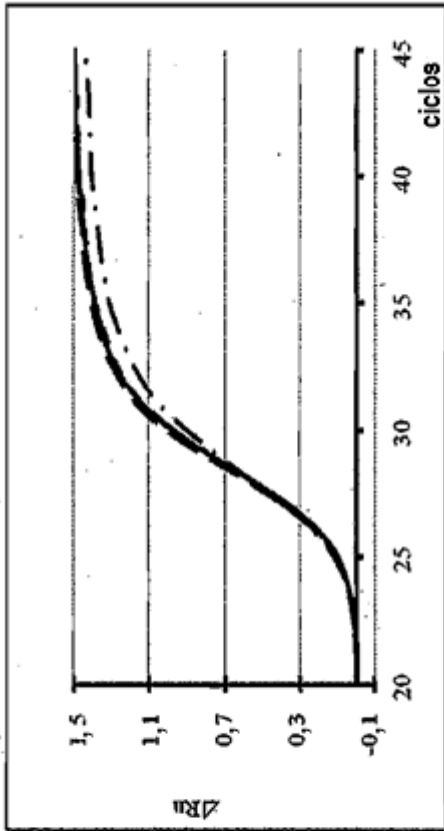
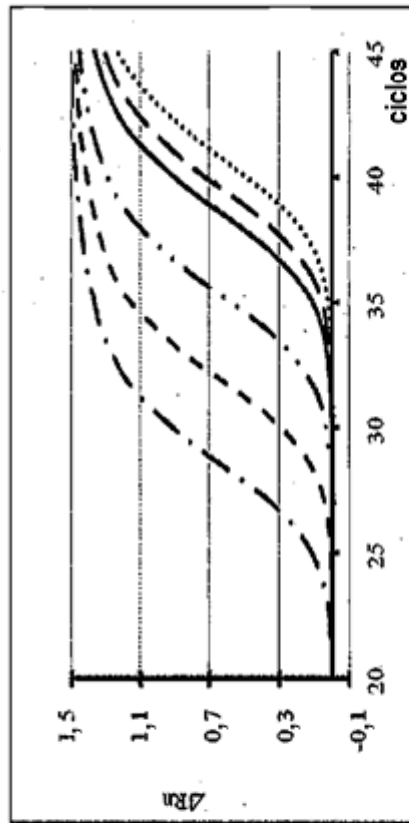


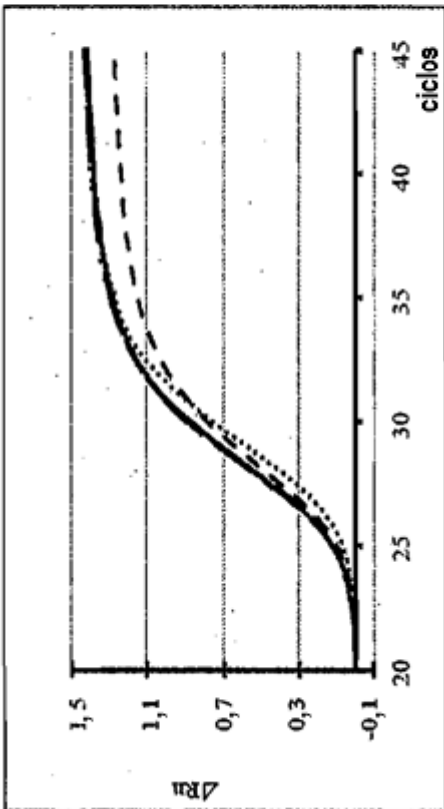
Fig. 6



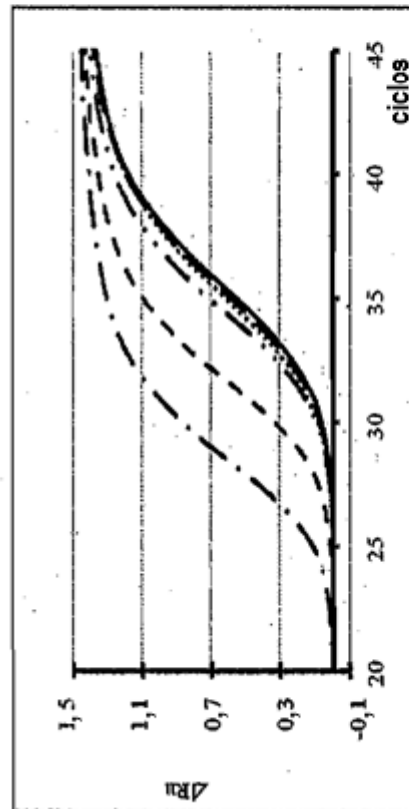
oligo 10 (PNA)



oligo 5 (BNA)



Oligo 8 (ADN)



Oligo 9 (LNA)

curva en la figura	M/(M+W) (%) en la muestra de ensayo
—	100
- - -	10
- · - ·	1
- / - /	0,1
- · · ·	0,01
· · ·	0

Fig. 7

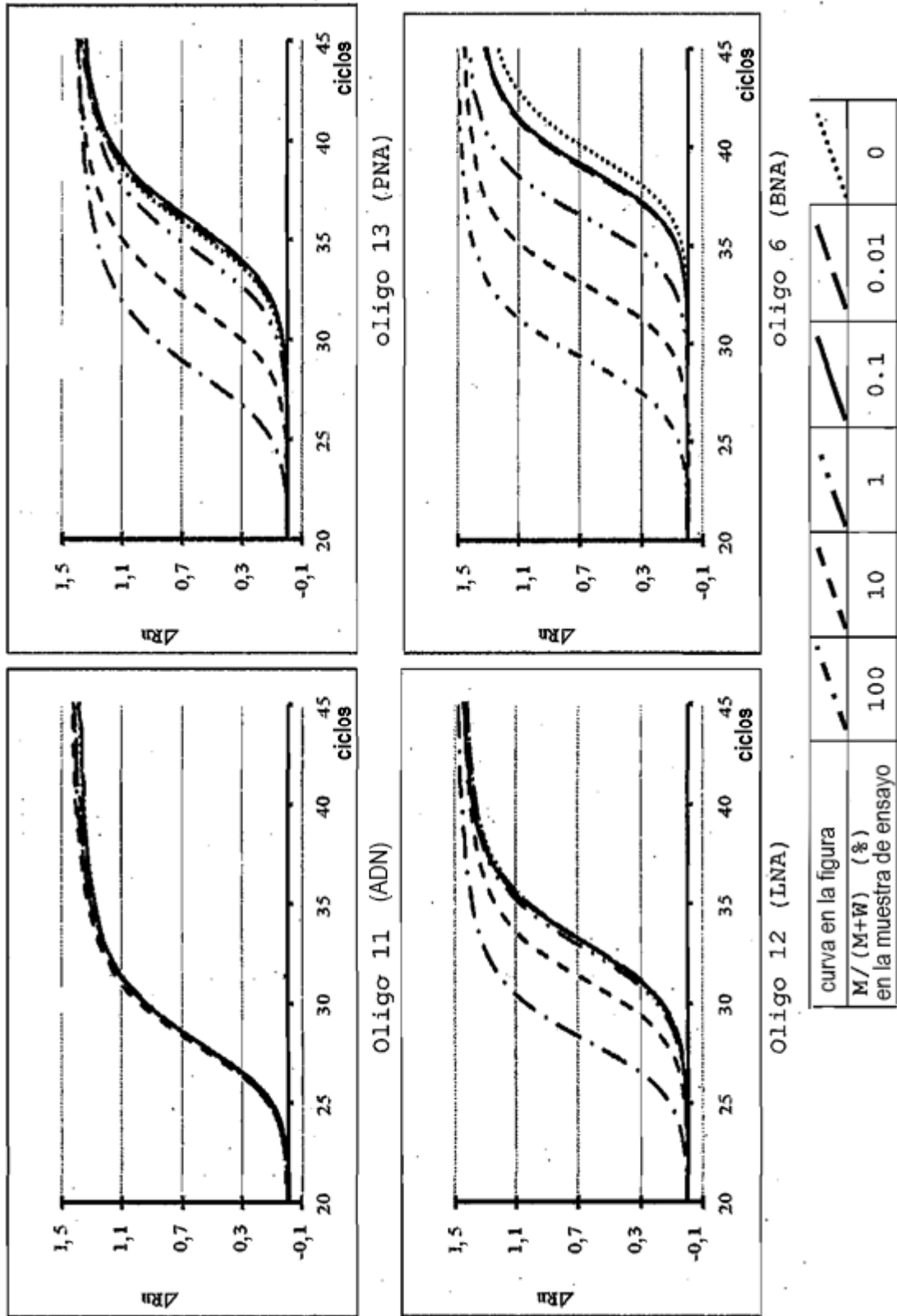


Fig. 8

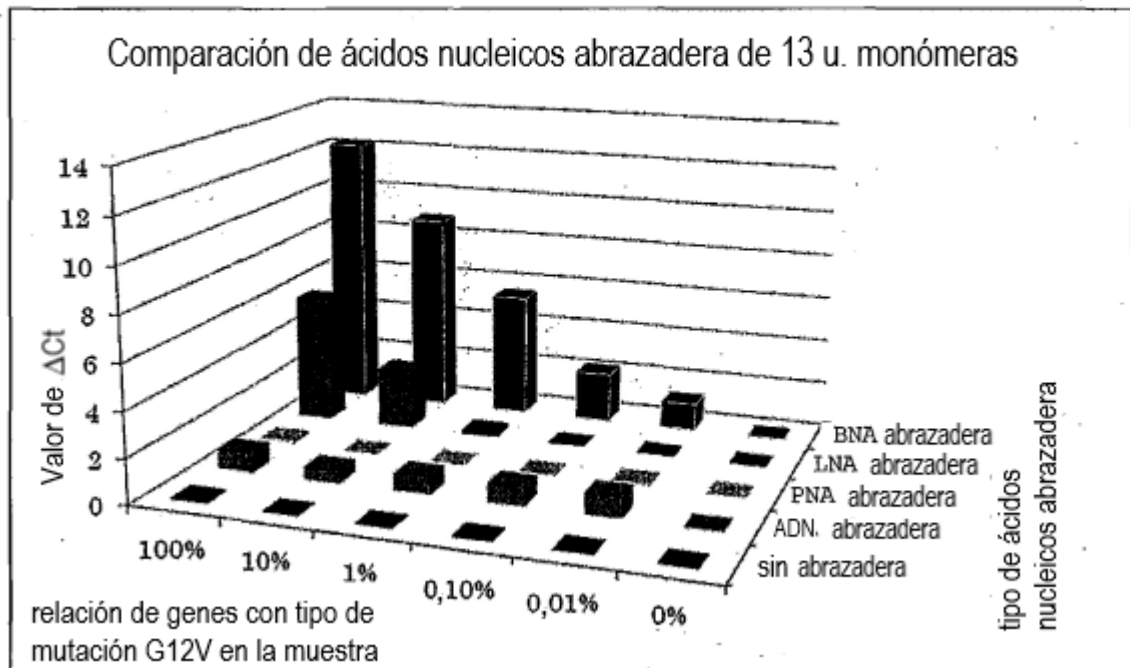


Fig. 9

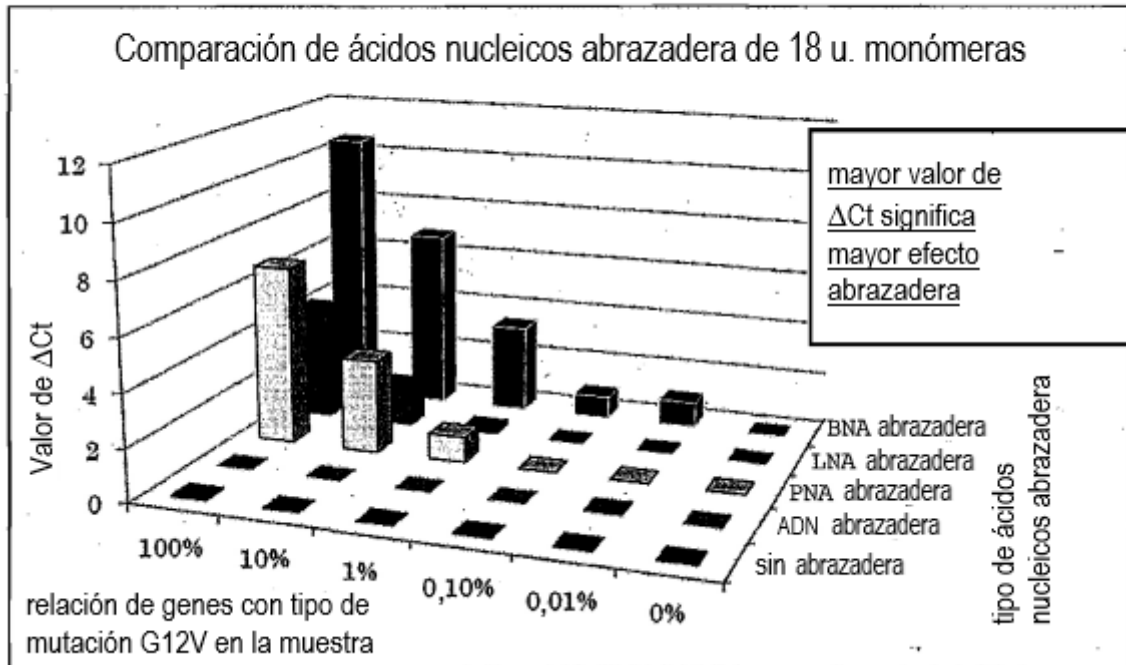
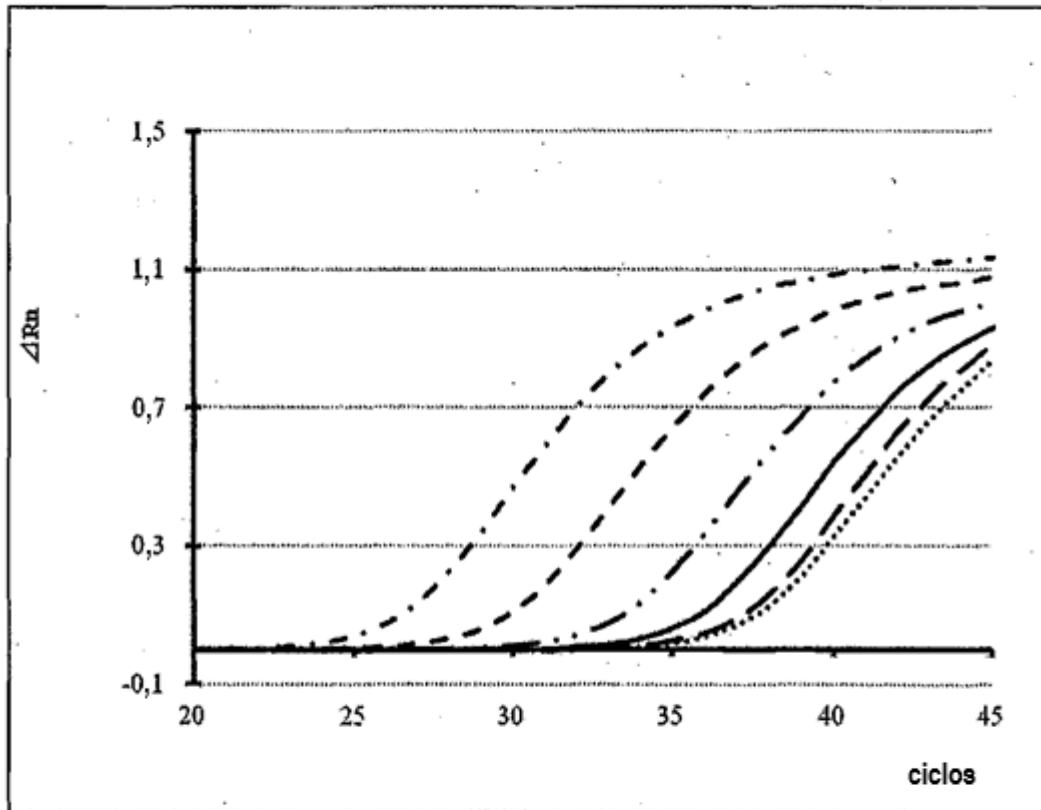
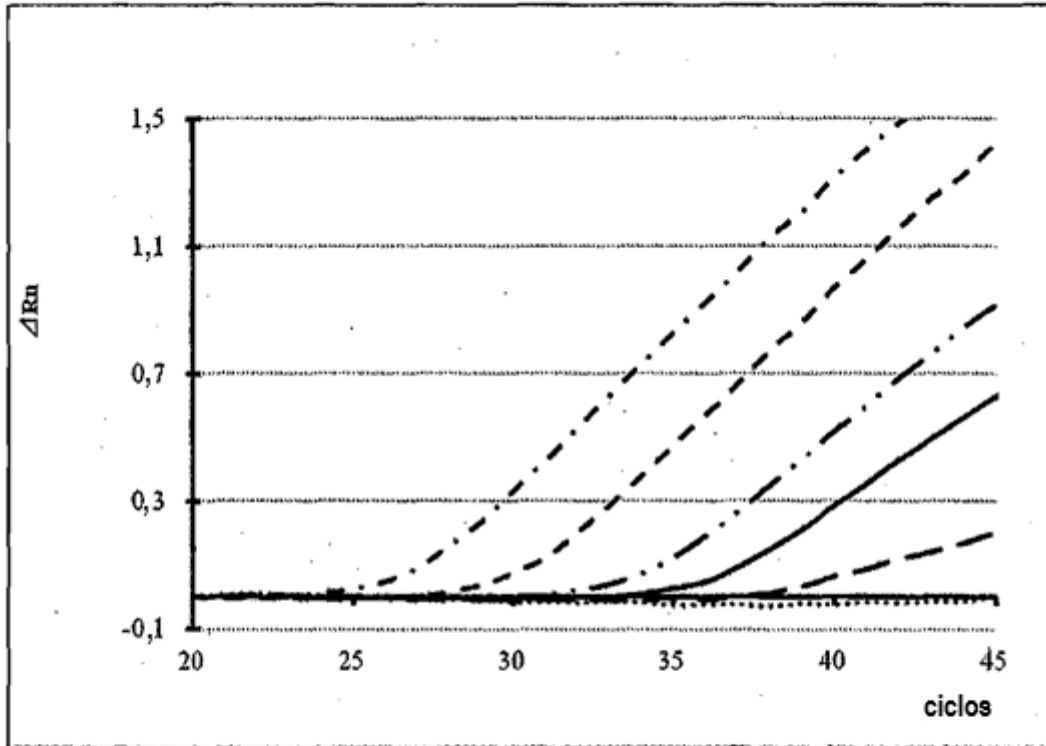


Fig. 10



curva en la figura						
M/ (M+W) (%) en la muestra de ensayo	100	10	1	0,1	0,01	0
valor ct	23,54	26,94	30,53	32,87	34,25	34,66
Δct (0%-X%)	11,12	7,72	4,13	1,79	0,41	

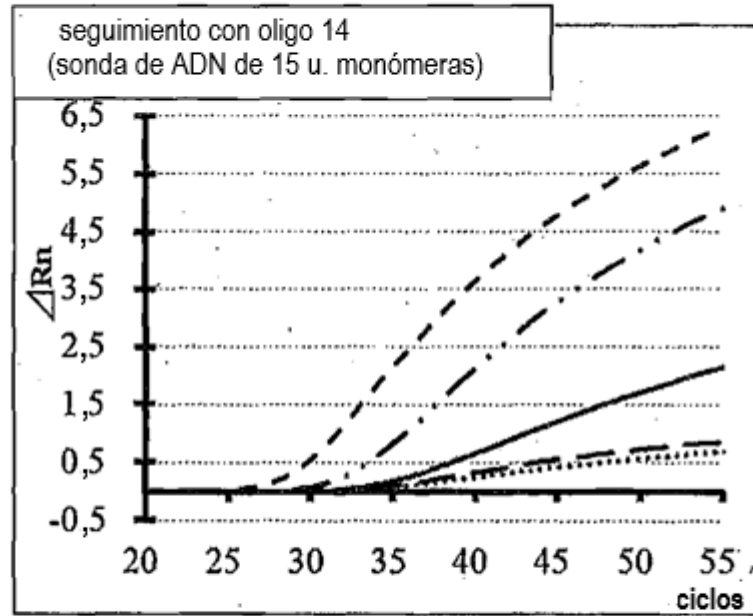
Fig. 11



curva en la figura						
M/ (M+W) (%) en la muestra de ensayo	100	10	1	0,1	0,01	0
valor ct	23,07	26,64	30,17	32,89	36,81	no detectado
ΔCt (0%-X%)	-	-	-	-	-	-

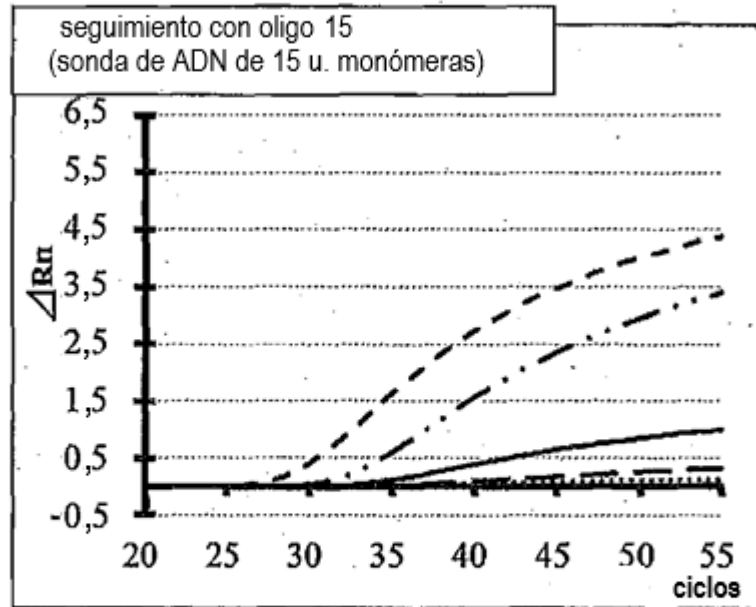
Fig. 12

a)



curva en la figura:					
M/ (M+W) (%)	10%	1%	0,1%	0,01%	0%
valor ct	23,39	26,80	29,74	30,22	30,43
valor ΔCt . (0%-X%)	7,04	3,63	0,70	0,21	

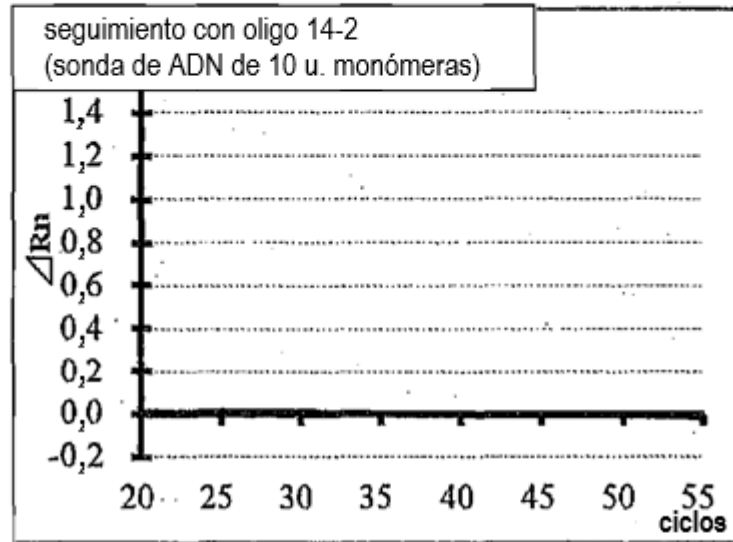
b)



curva en la figura					
M/(M+W) (%)	10%	1%	0,1%	0,01%	0%
valor c_t	24,49	27,92	30,71	33,80	34,71
valor Δc_t (0%-X%)	10,22	6,79	4,00	0,91	

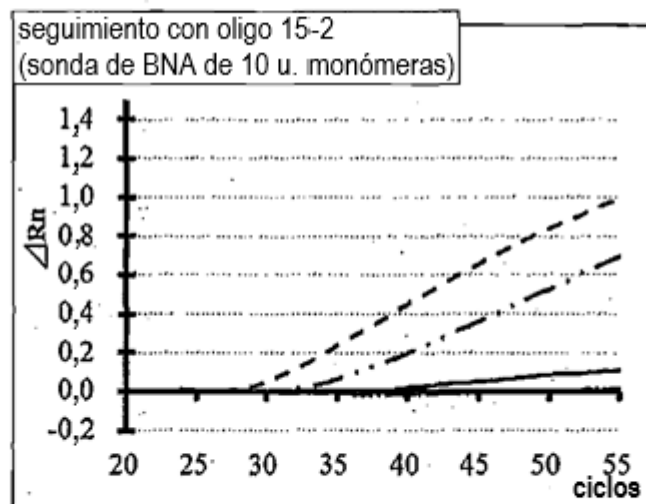
Fig. 13

a)



curva en la figura					
M/ (M+W) (%)	10%	1%	0,1%	0,01%	0%
valor ct	-	-	-	-	-
valor Δct (0%-X%)	-	-	-	-	-

b)



curva en la figura					
M/ (M+W) (%)	10%	1%	0,1%	0,01%	0%
valor ct	29,55	34,10	46,20	-	>55
valor Δct (0%-X%)	>25,45	>20,90	>8,80	-	-

Fig. 14

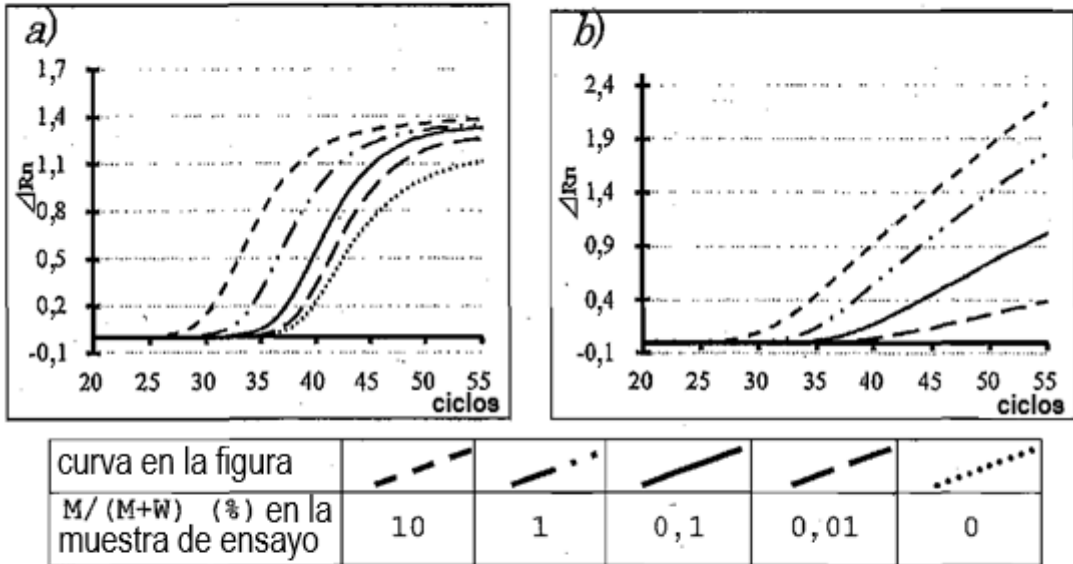


Fig. 15

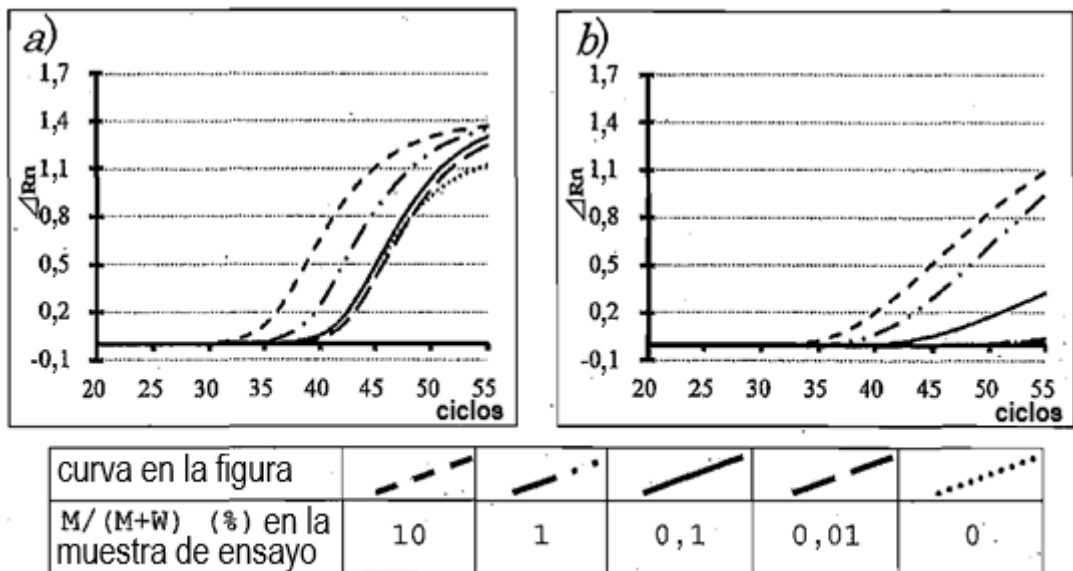


Fig. 16

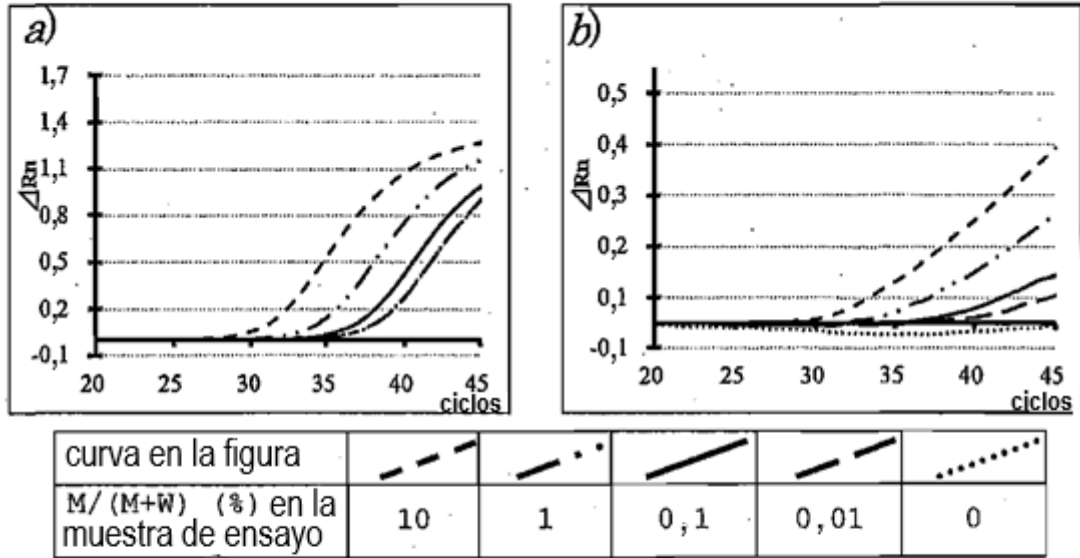


Fig. 17

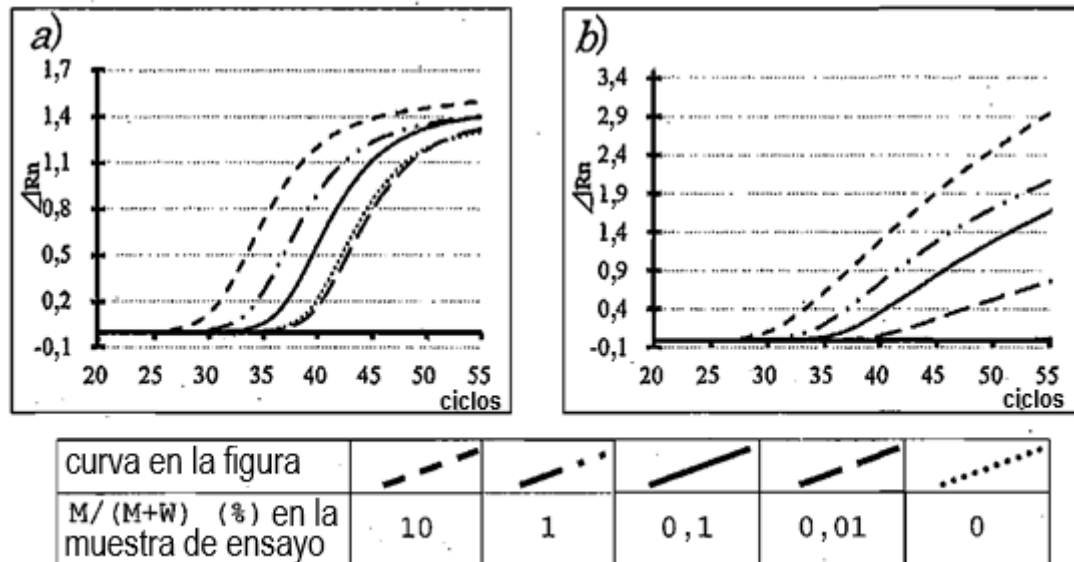


Fig. 18

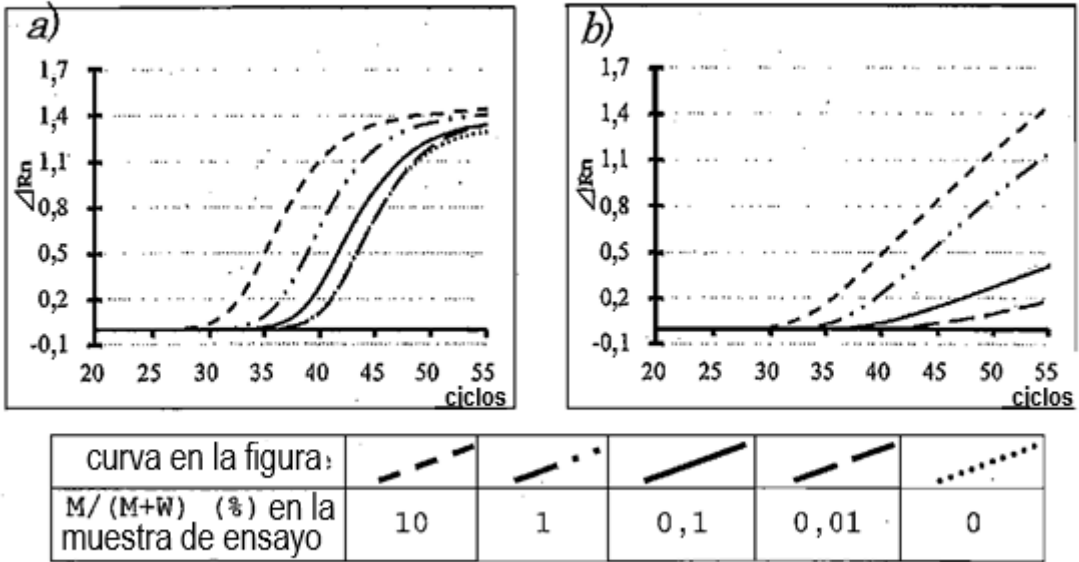


Fig. 19

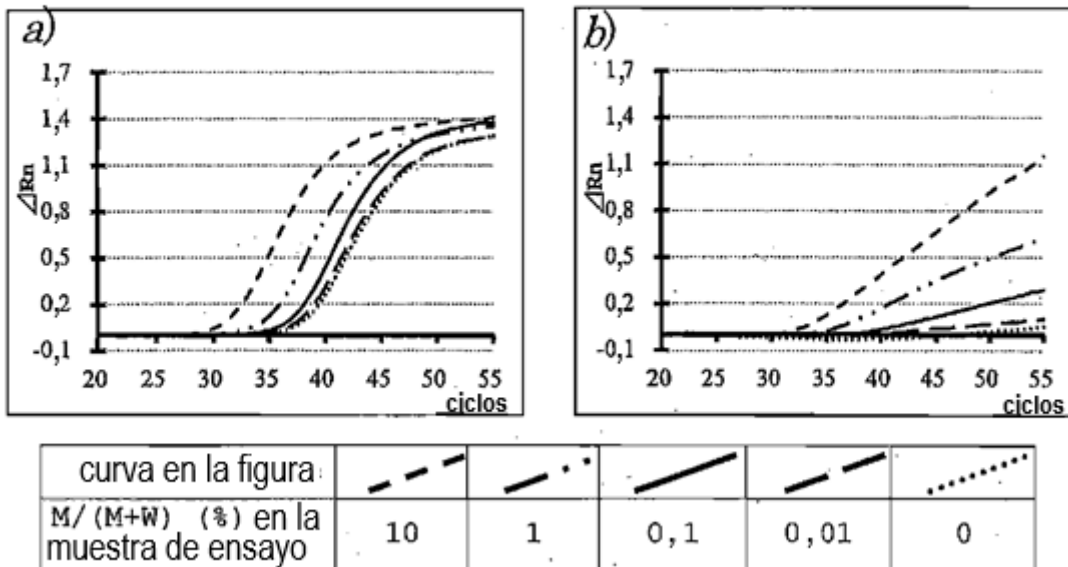


Fig. 20

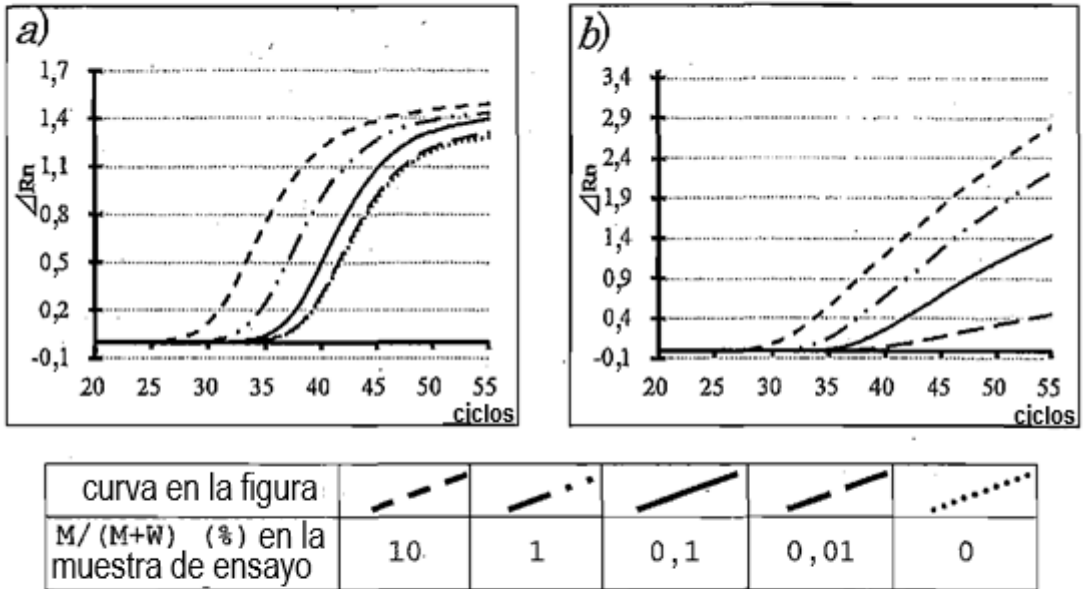


Fig. 21

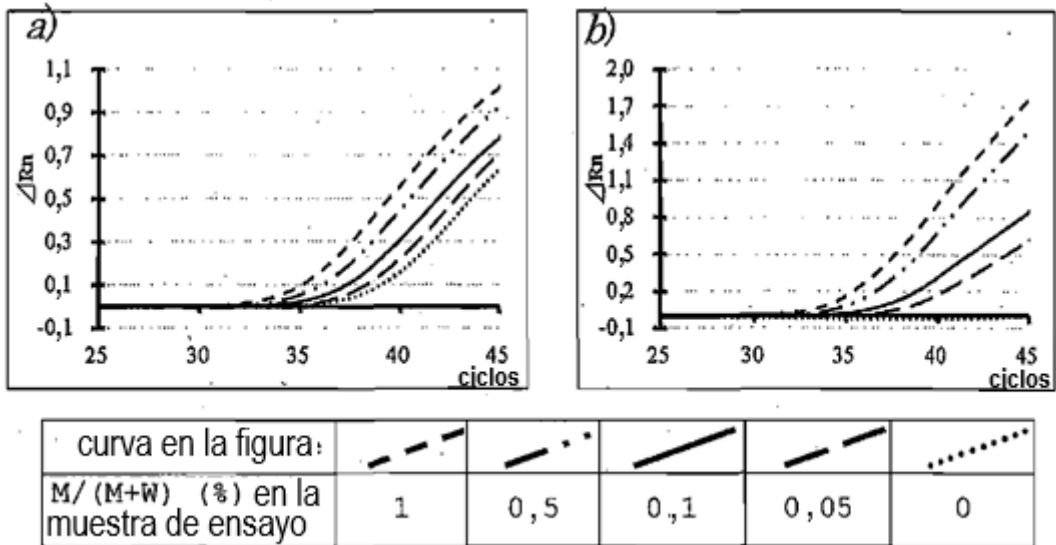


Fig. 22

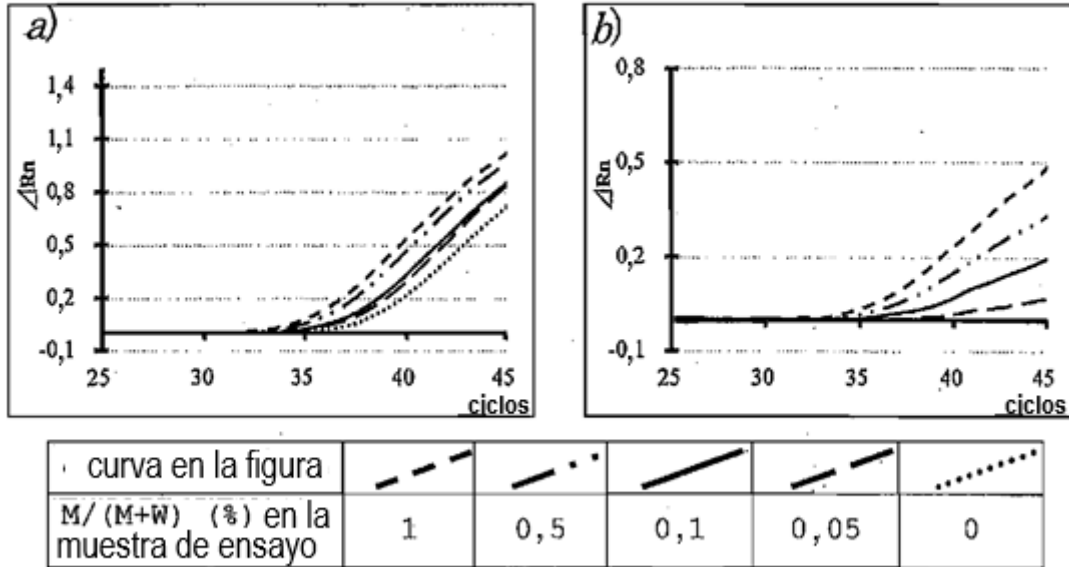


Fig. 23

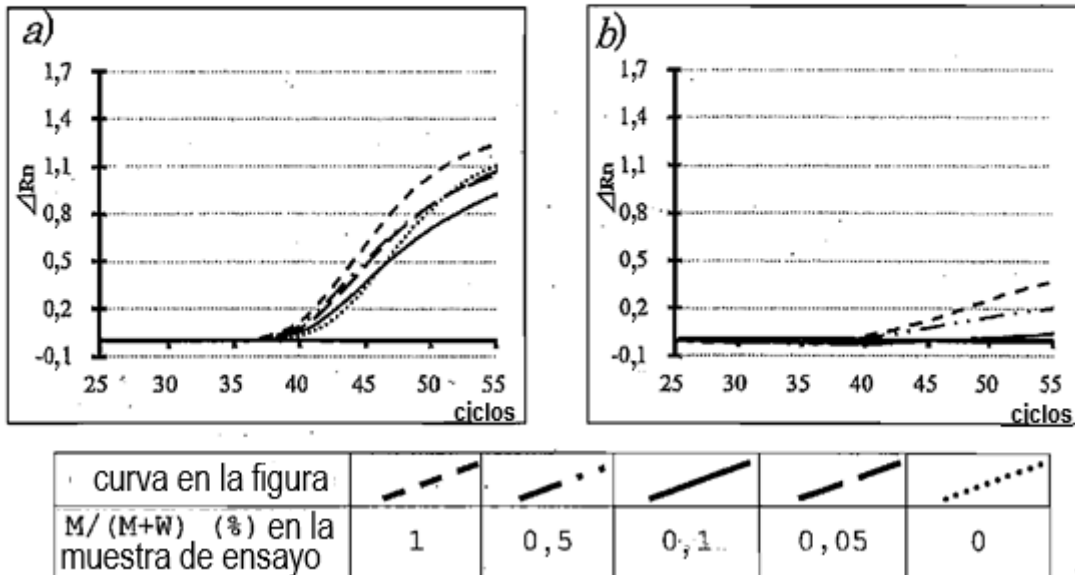
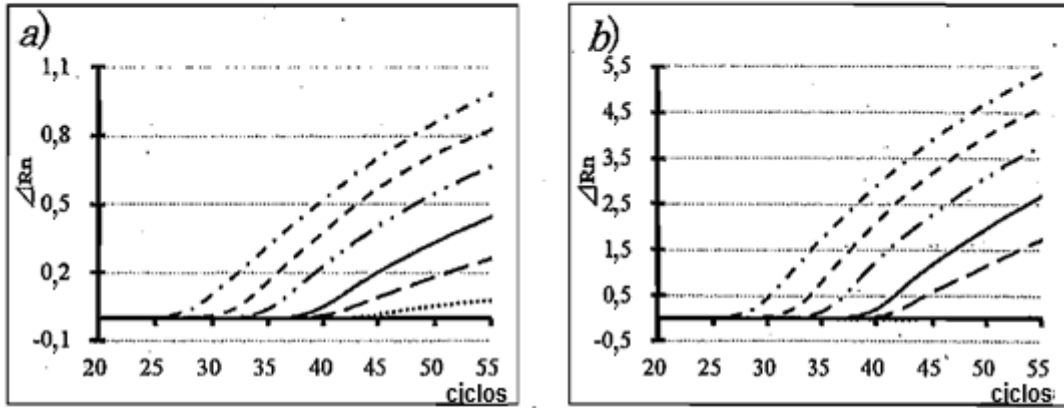


Fig. 24



curva en la figura						
M/(M+W) (%) en la muestra de ensayo	100	10	1	0,1	0,01	0

Fig. 25

