

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 805 794**

51 Int. Cl.:

C12N 15/09 (2006.01)

C12Q 1/68 (2008.01)

G01N 33/53 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **19.07.2013 PCT/JP2013/069694**

87 Fecha y número de publicación internacional: **23.01.2014 WO14014106**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **19.07.2013 E 13820642 (0)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **03.06.2020 EP 2878671**

54 Título: **Procedimiento de fotoacoplamiento que utiliza una sonda que contiene ácidos nucleicos fotosensibles**

30 Prioridad:

20.07.2012 JP 2012161834

11.12.2012 JP 2012270614

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

15.02.2021

73 Titular/es:

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

72 Inventor/es:

**WAKAMATSU, HIROTAKE;
YANAGIHARA, AKIRA;
TERASAKI, HIROSHI;
FUGONO, NOBUTAKE;
SHIMADZU, MITSUNOBU y
FUJIMOTO, KENZO**

74 Agente/Representante:

GONZÁLEZ PECES, Gustavo Adolfo

Observaciones:

Véase nota informativa (Remarks, Remarques o Bemerkungen) en el folleto original publicado por la Oficina Europea de Patentes

ES 2 805 794 T3

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

DESCRIPCIÓN

Procedimiento de fotoacoplamiento que utiliza una sonda que contiene ácidos nucleicos fotosensibles

Campo técnico

5 La presente invención se refiere a un procedimiento para el fotoacoplamiento con una sonda que comprende nucleótidos fotosensibles.

Antecedentes de la técnica

En los últimos años, para establecer una medicina personalizada, que es un tratamiento a medida para pacientes individuales, se ha propuesto una investigación para revelar la relación entre polimorfismos genéticos específicos de pacientes y la sensibilidad a los medicamentos o la respuesta a los medicamentos.

10 En particular, con avances en la ciencia del genoma, la farmacocinética y los polimorfismos de enzimas, las proteínas, y similares, involucradas en la respuesta al fármaco se están dilucidando rápidamente. En el análisis del genoma humano, los polimorfismos de un solo nucleótido (SNP, por sus siglas en inglés) están atrayendo la atención como los marcadores de polimorfismo más frecuentes. Ya se sabe que los SNP son útiles para dilucidar la relación entre diversas enfermedades y la respuesta al fármaco. Además, también se sabe que un análisis de haplotipos usando una pluralidad de SNP es útil para analizar la susceptibilidad a la enfermedad.

15 Especialmente en el campo de la medicina, se considera un uso en el diagnóstico de prevalencia de la enfermedad utilizando los resultados de detección de SNP, un uso en la selección de un fármaco de administración eficaz, un uso en la predicción de efectos secundarios y similares, y se espera que lleve a la mejora de la calidad de vida de los pacientes, así como a un aumento en el efecto terapéutico. Se han documentado muchas técnicas para determinar las bases de dichos sitios de SNP, denominadas tipificado. Como técnica para tipificar el polimorfismo de un solo nucleótido de ADN, un procedimiento de PCR TaqMan, un procedimiento Invader y similares, se conocen como técnicas que tienen una alta selectividad de secuencia suficiente para identificar una sustitución de base única.

20 Sin embargo, en la detección de mutaciones adquiridas como neoplasias malignas, dado que la molécula de ácido nucleico de tipo silvestre se obtiene de células normales, que son componentes principales de una muestra a analizar, es el fondo, a menudo es imposible detectar mutaciones, como una sustitución de base única con alta sensibilidad en los procedimientos de análisis descritos anteriormente.

25 Por lo tanto, como una técnica de análisis particularmente eficaz como alternativa a los procedimientos anteriores, se desvela un uso de nucleótidos fotosensibles. Un nucleótido fotosensible y un nucleótido diana que hibridan entre sí pueden formar un fotoacoplamiento llevando a cabo una fotoirradiación a una longitud de onda específica. Este fotoacoplamiento se produce mediante la formación de un enlace covalente intermolecular entre la molécula de nucleótido fotosensible y la molécula de nucleótido diana, causada por una fotorreacción de un resto de base artificial. Las moléculas fotoacopladas entre sí de esta manera no se ensamblan simplemente con una estabilidad térmica y, por lo tanto, incluso si se ponen en condiciones en las que un dúplex complementario se disocia, las moléculas no se disocian y permanecen unidas (Referencia de patentes 1).

30 Se desvela una técnica de análisis para detectar genes mutados usando nucleótidos fotosensibles, basándose en las propiedades de los nucleótidos fotosensibles, es decir, los hallazgos de que la reacción de fotoacoplamiento avanza muy rápidamente en aproximadamente 1 segundo, y que el fotoacoplamiento no ocurre si la hibridación no está completa (Referencia de patentes 2).

35 El documento US2011/0033855 A1 y Yoshinga Yoshimura y col.: "Hikari Oto Gata Kakusan Probe o Mochiita Ine Genome SNPs Kaiseki", CSJ, The Chemical Society of Japan Koen Yokoshu, vol. 91ST, n.º 4, (11-03-2011), página 1579, desvela sondas de moléculas de ácido nucleico.

40 Las referencias de patentes 1 y 2 desvelan la identificación de SNP usando los nucleótidos fotosensibles. Sin embargo, solo desvelan ejemplos en los que el uso de los nucleótidos fotosensibles es útil en la amplificación selectiva de genes mutados, basándose en los hallazgos de que el fotoacoplamiento se da cuando una sonda que contiene el nucleótido fotosensible hibrida con un sitio diana que tiene una secuencia complementaria a la sonda.

45 Por lo tanto, en vista de tal conocimiento técnico común convencional, se ha considerado que el nucleótido fotosensible se une solo con el sitio diana que tiene una secuencia complementaria, o una secuencia de nucleótidos diana en la vecindad del sitio diana, porque es necesario para el fotoacoplamiento que la sonda que contiene el nucleótido fotosensible hibride con el sitio diana que tiene su secuencia complementaria, y el fotoacoplamiento se forma mediante la unión del nucleótido fotosensible con el sitio diana, o la secuencia de nucleótidos diana en las proximidades del sitio diana.

Listado de citas**Referencia de patente**

[Referencia de patente 1] JP 2009-254279 A
 [Referencia de patentes 2] WO 2012/033190

Sumario

Problema técnico

5 Los presentes inventores descubrieron que, en la reacción en la que una sonda que contenía un nucleótido fotosensible (es decir, una sonda de fotoacoplamiento) se fotoacoplaba con un nucleótido diana, el fotoacoplamiento se realizó solo hasta cierto porcentaje, independientemente de la cantidad de nucleótido diana, es decir, el fotoacoplamiento se estancó. Los presentes inventores realizaron estudios intensivos basados en los hallazgos y, como resultado, descubrieron que, como factores que estancaron el fotoacoplamiento, cuando la sonda que
 10 contenía el nucleótido fotosensible fue fotoirradiada para el fotoacoplamiento con el nucleótido diana, se produjo el fotoacoplamiento en la secuencia propia de la sonda. Es decir, se presumió que, dado que el nucleótido fotosensible en la sonda se ensambló y se fotoacopló con una base capaz de fotoacoplarse con el nucleótido fotosensible, se acumuló una sonda que no podía hibridar con el sitio diana y/o que no se podía fotoacoplar con el nucleótido diana dependiendo del tiempo de fotoirradiación (energía), y como resultado, el fotoacoplamiento contra el nucleótido
 15 diana se estancó.

Adicionalmente, en vista del conocimiento técnico común convencional, en el caso en el que la amplificación de un gen de tipo silvestre se suprime de manera selectiva (amplificación suprimida), y un gen mutado se amplifica de manera selectiva, la máxima ventaja del procedimiento de fotoacoplamiento utilizando nucleótidos fotosensibles, tal como se desvela en la referencia de patentes 2, es el hecho de que el nucleótido diana que una vez se ha
 20 fotoacoplado por foto no se escinde en la etapa de desnaturalización por calor de una etapa de reacción de PCR, es decir, que el nucleótido diana que se ha fotoacoplado una vez por foto se puede llevar a un sistema de no equilibrio.

Sin embargo, los presentes inventores descubrieron que incluso cuando se fotoirradia a una longitud de onda capaz del fotoacoplamiento (365 nm), no solo se fotoacopla la sonda con el nucleótido diana, sino que también parte de la sonda que se ha fotoacoplado con el nucleótido diana se liberó a través de una reacción de fotoescisión, que no se
 25 da de forma natural. Es decir, se consideró que el estado de equilibrio de la luz en el que tuvo lugar de manera simultánea la reacción de fotoacoplamiento y la reacción de fotoacoplamiento-escisión fue un factor que estancó el fotoacoplamiento contra el nucleótido diana.

Un objeto de la presente invención es resolver el problema de que el fotoacoplamiento con un nucleótido diana usando una sonda que contiene nucleótidos fotosensibles se estanca, y proporcionar un procedimiento para mejorar
 30 la eficacia del fotoacoplamiento, y un kit de los mismos.

Solución al problema

Los presentes inventores estudiaron intensamente los medios para resolver el problema y, como resultado, descubrieron que para evitar el estancamiento de la eficacia del fotoacoplamiento, la concentración eficaz de la sonda que contiene el nucleótido fotosensible se mantuvo en una solución de reacción suprimiendo el
 35 fotoacoplamiento en la secuencia propia de la sonda, y esa hibridación se podría promover y la eficacia del fotoacoplamiento se podría mejorar aumentando la concentración sustancial de la sonda que contiene el nucleótido fotosensible, localmente alrededor del sitio diana.

La presente invención se refiere a las realizaciones tal como se definen en las reivindicaciones. En particular, la invención se refiere a un procedimiento de fotoacoplamiento, caracterizado por hibridar con un sitio diana presente
 40 en una muestra de ácido nucleico con una primera sonda que tiene una secuencia complementaria al sitio diana y que contiene un nucleótido fotosensible, en una solución de reacción, y llevar a cabo el fotoacoplamiento por fotoirradiación, en el que el autoensamblaje causado por el nucleótido fotosensible contenido en la primera sonda se suprime coexistiendo con una segunda sonda que es altamente complementaria a la primera sonda, y en el que la primera sonda y la segunda sonda están diseñadas de manera que el nucleótido fotosensible en la primera sonda no
 45 está fotoacoplado con la segunda sonda, en la que ser altamente complementaria significa un estado en el que la primera sonda y la segunda sonda son complementarias entre sí, y una base en la primera sonda que se fotoacopla con el nucleótido fotosensible en condiciones predeterminadas de fotoacoplamiento hibrida con la segunda sonda. Además, la invención se refiere a un kit de fotoacoplamiento, caracterizado porque comprende una primera sonda que tiene una secuencia complementaria a un sitio diana presente en una muestra de ácido nucleico, y que contiene
 50 un nucleótido fotosensible, y una segunda sonda que es altamente complementaria a la primera sonda, en la que la primera sonda y la segunda sonda están diseñadas de modo que el nucleótido fotosensible en la primera sonda no esté fotoacoplado con la segunda sonda, y en la que ser altamente complementario significa un estado en el que la primera sonda que contiene un nucleótido fotosensible y la segunda sonda son complementarias entre sí, y una base que se va a fotoacoplar con el nucleótido fotosensible en la secuencia propia de la primera sonda en
 55 condiciones predeterminadas de fotoacoplamiento hibrida con la segunda sonda complementaria.
 La divulgación se refiere a:

[1] un procedimiento de fotoacoplamiento, caracterizado por hibridar con un sitio diana presente en una muestra de ácido nucleico con una primera sonda que tiene una secuencia complementaria al sitio diana y que contiene

- un nucleótido fotosensible, en una solución de reacción, y llevar a cabo el fotoacoplamiento por fotoirradiación, en el que se suprime el autoensamblaje causado por el nucleótido fotosensible contenido en la primera sonda,
- [2] el procedimiento de fotoacoplamiento de [1], caracterizado porque el autoensamblaje causado por el nucleótido fotosensible contenido en la primera sonda se suprime coexistiendo con una segunda sonda que es altamente complementaria a la primera sonda,
- [3] el procedimiento de fotoacoplamiento de [1] o [2], en el que ser altamente complementario significa un estado en el que la primera sonda y la segunda sonda son complementarias entre sí, y una base que se va a fotoacoplar con el nucleótido fotosensible en la primera sonda en condiciones predeterminadas de fotoacoplado hibrida con la segunda sonda,
- [4] el procedimiento de fotoacoplamiento de cualquiera de [1] a [3], en el que un nucleótido diana contenido en el sitio diana presente en la muestra de ácido nucleico se fotoacopla con el nucleótido fotosensible contenido en la primera sonda,
- [5] el procedimiento de fotoacoplamiento de cualquiera de [1] a [4], en el que la segunda sonda contiene un nucleótido fotosensible,
- [6] el procedimiento de fotoacoplamiento de cualquiera de [1] a [5], en el que la primera sonda y la segunda sonda contienen nucleótidos fotosensibles, y una tercera sonda que tiene una secuencia complementaria a la primera sonda y/o la segunda sonda se usa de modo que el nucleótido fotosensible o los nucleótidos fotosensibles presentes en la primera sonda y/o la segunda sonda no se pueden acoplar por sí misma en una región no complementaria entre la primera sonda y la segunda sonda,
- [7] el procedimiento de fotoacoplamiento de [1], caracterizado por hibridar un sitio diana presente en una muestra de ácido nucleico, una primera sonda que tiene una secuencia complementaria al sitio diana y que contiene un nucleótido fotosensible, y una cuarta sonda que tiene una secuencia complementaria al sitio diana y que contiene un nucleótido diana, de modo que se coloquen adyacentes en una solución de reacción, y lleven a cabo el fotoacoplamiento por fotoirradiación entre el nucleótido diana contenido en la cuarta sonda y el nucleótido fotosensible contenido en la primera sonda, en el que el fotoacoplamiento de la primera sonda se suprime coexistiendo con una segunda sonda que es altamente complementaria a la primera sonda,
- [8] el procedimiento de fotoacoplamiento de cualquiera de [1] a [7], caracterizado por usar la primera sonda en la que un nucleótido que se autoensambla con el nucleótido fotosensible en la primera sonda se sustituye por un nucleótido que no es capaz de fotoacoplarse con el nucleótido fotosensible, y caracterizado porque ese fotoacoplamiento de la primera sonda en sí se suprime,
- [9] el procedimiento de fotoacoplamiento de [8], en el que el nucleótido que no es capaz de fotoacoplarse con el nucleótido fotosensible es una base de purina,
- [10] el procedimiento de fotoacoplamiento de [8], en el que el nucleótido que no es capaz de fotoacoplarse con el nucleótido fotosensible es una base sintética obtenida mediante la conversión artificial de un anillo de pirimidina,
- [11] el procedimiento de fotoacoplamiento de cualquiera de [1] a [10], en el que una sustancia aniónica está contenida en la solución de reacción,
- [12] el procedimiento de fotoacoplamiento de cualquiera de [1] a [11], caracterizado porque al menos una sonda de fotoacoplamiento está contenida a una concentración de 0,1 $\mu\text{mol/l}$ o más en la solución de reacción,
- [13] Un procedimiento para el análisis de genes, que usa el procedimiento de fotoacoplamiento de cualquiera de [1] a [12],
- [14] el procedimiento para el análisis de genes de [13], que es un procedimiento para la detección de genes o un procedimiento para la amplificación de ácido nucleico,
- [15] un procedimiento para la detección de ácido nucleico mutado, caracterizado porque el procedimiento para la amplificación de ácido nucleico descrito en la reivindicación 14 es un procedimiento para detectar la presencia o ausencia del ácido nucleico mutado, amplificando selectivamente una secuencia de nucleótidos para la amplificación que contiene un sitio diana del ácido nucleico mutado,
- [16] un kit de fotoacoplamiento, caracterizado porque comprende una primera sonda que tiene una secuencia complementaria a un sitio diana presente en una muestra de ácido nucleico, y que contiene un nucleótido fotosensible, y una segunda sonda que es altamente complementaria a la primera sonda,
- [17] el kit de fotoacoplamiento de [16], en el que la primera sonda es capaz de fotoacoplarse con un nucleótido diana contenido en el sitio diana presente en la muestra de ácido nucleico,
- [18] el kit de fotoacoplamiento de [16], que comprende además una cuarta sonda que contiene un nucleótido diana capaz de fotoacoplarse con el nucleótido fotosensible contenido en la primera sonda,
- [19] el kit de fotoacoplamiento de cualquiera de [16] a [18], en el que la segunda sonda contiene un nucleótido fotosensible, y
- [20] el kit de fotoacoplamiento de cualquiera de [16] a [19], en el que la primera sonda es una sonda en la cual un nucleótido que se autoensambla con el nucleótido fotosensible en la primera sonda se sustituye con un nucleótido que no es capaz de fotoacoplarse con el nucleótido fotosensible.

Efectos ventajosos de la invención

- De acuerdo con la presente invención, en un procedimiento de análisis de genes usando nucleótidos fotosensibles, se puede mejorar la eficacia del fotoacoplamiento entre el sitio diana y una sonda que contiene el nucleótido fotosensible. Es decir, la presente invención es eficaz en un procedimiento de análisis génico que requiere alta sensibilidad y alta especificidad, porque el fotoacoplamiento contra el nucleótido diana se puede llevar a cabo de manera específica y eficaz.

Breve descripción de los dibujos

[FIG. 1] La Figura 1 es la fórmula estructural de 3-cianovinilcarbazol (CNVK), como un ejemplo de nucleótidos fotosensibles.

[FIG. 2] La Figura 2 es un resultado obtenido llevando a cabo una fotoirradiación a una longitud de onda que forma el fotoacoplamiento, seguida de una fotoirradiación a una longitud de onda de separación del fotoacoplamiento, con respecto a una sonda de fotoacoplamiento, que fue diseñado para que parte de la región del exón 21 (ex.21) de un gen EGFR fuera la diana que forma el fotoacoplamiento, y el CNVK como nucleótidos fotosensibles se introdujo en una posición cercana al extremo terminal 5', y que confirma la muestra resultante por electroforesis.

[FIG. 3] La Figura 3 es un resultado obtenido llevando a cabo una fotoirradiación a una longitud de onda que forma el fotoacoplamiento, seguida de una fotoirradiación a una longitud de onda de separación del fotoacoplamiento, con respecto a una sonda de fotoacoplamiento, que fue diseñado para que parte de la región del exón 21 (ex.21) de un gen EGFR fuera la diana que forma el fotoacoplamiento, y el CNVK como nucleótidos fotosensibles se introdujo en una posición más cercana al centro que al extremo terminal 5', y que confirma la muestra resultante por electroforesis.

[FIG. 4] La Figura 4 es un resultado obtenido llevando a cabo una fotoirradiación a una longitud de onda que forma el fotoacoplamiento, seguida de una fotoirradiación a una longitud de onda de separación del fotoacoplamiento, con respecto a una sonda de fotoacoplamiento, que fue diseñado para que parte de la región del exón 21 (ex.21) de un gen EGFR fuera la diana que forma el fotoacoplamiento, y el CNVK como nucleótidos fotosensibles se introdujo en una posición más cercana al centro que al extremo terminal 3', y que confirma la muestra resultante por electroforesis.

[FIG. 5] La Figura 5 es un resultado obtenido llevando a cabo una fotoirradiación a una longitud de onda que forma el fotoacoplamiento, seguida de una fotoirradiación a una longitud de onda de separación del fotoacoplamiento, con respecto a una sonda de fotoacoplamiento, que fue diseñado para que parte de la región del exón 21 (ex.21) de un gen EGFR fuera la diana que forma el fotoacoplamiento, y el CNVK como nucleótidos fotosensibles se introdujo en una posición cercana al extremo terminal 3', y que confirma la muestra resultante por electroforesis.

[FIG. 6] La Figura 6 es un resultado obtenido llevando a cabo una fotoirradiación a una longitud de onda que forma el fotoacoplamiento, con respecto a una sonda de fotoacoplamiento que consiste solo en adenina (A), que no puede ser un nucleótido diana de CNVK y que confirma la muestra resultante por electroforesis.

[FIG. 7] La Figura 7 es un resultado obtenido llevando a cabo una fotoirradiación a una longitud de onda que forma el fotoacoplamiento, con respecto a una sonda de fotoacoplamiento que consiste solo en guanina (G), que no puede ser un nucleótido diana de CNVK y que confirma la muestra resultante por electroforesis.

[FIG. 8] La Figura 8 es un resultado obtenido llevando a cabo una fotoirradiación a una longitud de onda que forma el fotoacoplamiento, con respecto a una sonda de fotoacoplamiento que consiste solo en adenina (A) y guanina (G), que no puede ser un nucleótido diana de CNVK y que confirma la muestra resultante por electroforesis.

[FIG. 9] La Figura 9 son sondas de fotoacoplamiento diseñadas para que las mutaciones en tres posiciones de un gen EGFR sean sitios diana. Más particularmente, es un dibujo que muestra sondas de fotoacoplamiento diseñadas para cada una de las cadenas sentido y las cadenas antisentido y su complementariedad, en las que (1) la secuencia de ácido nucleico que codifica la 861^a leucina (L861) era el sitio diana, (2) la secuencia de ácido nucleico que codifica la 790^a treonina (T790) era el sitio diana, y (3) la secuencia de ácido nucleico que codificaba la 858^a leucina (L858) era el sitio diana.

[FIG. 10] La Figura 10 es un resultado obtenido llevando a cabo una fotoirradiación a una longitud de onda que forma el fotoacoplamiento, seguida de una fotoirradiación a una longitud de onda de separación del fotoacoplamiento, y confirmando la muestra resultante mediante electroforesis, en el caso en el que la secuencia de ácido nucleico que codifica la 861^a leucina (L861) de un gen EGFR era el sitio diana, y se diseñaron sondas de fotoacoplamiento para cada cadena sentido y cadena antisentido.

[FIG. 11] La Figura 11 es un resultado obtenido llevando a cabo una fotoirradiación a una longitud de onda que forma el fotoacoplamiento, seguida de una fotoirradiación a una longitud de onda de separación del fotoacoplamiento, y confirmando la muestra resultante mediante electroforesis, en el caso en el que la secuencia de ácido nucleico que codifica la 790^a treonina (T790) de un gen EGFR era el sitio diana, y se diseñaron sondas de fotoacoplamiento para cada cadena sentido y cadena antisentido.

[FIG. 12] La Figura 12 es un resultado obtenido llevando a cabo una fotoirradiación a una longitud de onda que forma el fotoacoplamiento, seguida de una fotoirradiación a una longitud de onda de separación del fotoacoplamiento, y confirmando la muestra resultante mediante electroforesis, en el caso en el que la secuencia de ácido nucleico que codifica la 858^a leucina (L858) de un gen EGFR era el sitio diana, y se diseñaron sondas de fotoacoplamiento para cada cadena sentido y cadena antisentido.

[FIG. 13] La Figura 13 es un gráfico que muestra la eficacia de formación del fotoacoplamiento cuando se cambió la temperatura de hibridación y se formó el fotoacoplamiento, en el caso en el que la secuencia de ácido nucleico que codifica la 790^a treonina (T790) de un gen EGFR era el sitio diana, y se diseñaron sondas de fotoacoplamiento para cada cadena sentido y cadena antisentido.

[FIG. 14] La Figura 14 es un gráfico que muestra la eficacia de formación del fotoacoplamiento cuando se añadió ácido poliacrílico como promotor de la hibridación, se realizó una hibridación a 4 °C y se formó el fotoacoplamiento, en el caso en el que la secuencia de ácido nucleico que codifica la 790^a treonina (T790) de un

gen EGFR era el sitio diana, y se diseñaron sondas de fotoacoplamiento para cada cadena sentido y cadena antisentido.

[FIG. 15] La Figura 15 es un gráfico que muestra la eficacia de formación del fotoacoplamiento cuando se añadió ácido poliacrílico como promotor de la hibridación, se realizó una hibridación a 50 °C y se formó el fotoacoplamiento, en el caso en el que la secuencia de ácido nucleico que codifica la 790^a treonina (T790) de un gen EGFR era el sitio diana, y se diseñaron sondas de fotoacoplamiento para cada cadena sentido y cadena antisentido.

[FIG. 16] La Figura 16 es un gráfico que muestra el resultado de una medición cuantitativa por PCR, en el caso en el que la secuencia de ácido nucleico que codifica la 790^a treonina (T790) de un gen EGFR era el sitio diana, y se realizó una detección de mutación genética.

[FIG. 17] La Figura 17 es un resultado obtenido llevando a cabo una fotoirradiación a una longitud de onda que forma el fotoacoplamiento, seguida de una fotoirradiación a una longitud de onda de separación del fotoacoplamiento, y confirmando la muestra resultante mediante electroforesis, con respecto a una sonda de fotoacoplamiento, que fue diseñada de modo que parte de la región del exón 21 (ex.21) de un gen EGFR era la diana que forma el fotoacoplamiento, el CNVK como nucleótidos fotosensibles se introdujo en una posición cercana al extremo terminal 5' y las bases de pirimidina, capaces de formar fotoacoplamientos con CNVK, se reemplazaron con inosina.

[FIG. 18] La Figura 18 es un gráfico que muestra la eficacia de formación del fotoacoplamiento cuando las sondas de fotoacoplamiento diseñadas para un gen EGFR en el Ejemplo 8-1. se usaron para formar el fotoacoplamiento.

[FIG. 19] La Figura 19 es un dibujo que muestra sondas de fotoacoplamiento diseñadas para cada una de las cadenas sentido y las cadenas antisentido y su complementariedad, en las que la secuencia de ácido nucleico que codifica la 861^a leucina (L861) en la región del exón 21 (ex.21) de un gen EGFR era el sitio diana.

[FIG. 20] La Figura 20 es un gráfico que muestra la eficacia de formación del fotoacoplamiento cuando las sondas de fotoacoplamiento diseñadas para un gen EGFR en el Ejemplo 10-1. se usaron para formar el fotoacoplamiento.

Descripción de las realizaciones

En lo sucesivo, en el presente documento, las realizaciones de la presente invención se explicarán en detalle con referencia a los dibujos, pero los procedimientos de utilización y las realizaciones del kit no se limitan a las siguientes realizaciones.

Las definiciones de los términos tal como se usan en el presente documento, tales como ADN, ARN, transmisión génica, código, molde, promotor, cebador, PCR y secuencia, son los mismos que los utilizados actualmente y comúnmente en biología molecular, genética, ingeniería genética, y similares.

El término "ácido nucleico" tal como se usa en el presente documento no está limitado, siempre que sea ADN o ARN, o los análogos de ácido nucleico descritos a continuación. El ácido nucleico puede ser un compuesto natural o un compuesto sintético. Los ejemplos del ácido nucleico natural incluyen ADN genómico, ARNm, ARNt, ARNr y ARNhn, que se recogen de los organismos. Los ejemplos del ácido nucleico sintético incluyen ADN sintetizado por un procedimiento de síntesis química conocido, tal como un procedimiento de β -cianoetilfosforamidita o un procedimiento de síntesis de ADN en fase sólida, ácido nucleico sintetizado por un procedimiento conocido de amplificación de ácido nucleico tal como PCR, y ADNc sintetizado por una reacción de transcripción inversa.

La expresión "muestra de ácido nucleico" tal como se usa en el presente documento no está limitado, siempre que sea una muestra que contenga ácido nucleico y se sospeche que comprende un sitio diana. Es, por ejemplo, una muestra sospechosa de contener al menos uno de un ácido nucleico de tipo silvestre que tiene un sitio diana y su ácido nucleico mutado, y preferentemente una muestra sospechosa de contener ambos ácidos nucleicos. Los ejemplos de la muestra de ácido nucleico incluyen ADN genómico o ARN obtenido de células enteras contenidas en una muestra tal como sangre o tejidos. El ácido nucleico se puede extraer de una muestra mediante un procedimiento convencional tal como un procedimiento de fenol/cloroformo. En relación con esto, el porcentaje de presencia del ácido nucleico mutado en la muestra de ácido nucleico no está limitado. Por ejemplo, puede ser el 100 % de un ácido nucleico de tipo silvestre, o el 50 % de un ácido nucleico de tipo silvestre y el 50 % de un ácido nucleico mutado. La muestra de ácido nucleico puede ser ADN genómico obtenido de células, ARNm preparados a partir de células, o ADNc obtenidos mediante una reacción de transcripción inversa usando ARNm como molde. Además, la muestra de ácido nucleico puede ser una mezcla artificial de varios genes clonados, ácido nucleico amplificado artificialmente por un procedimiento de amplificación de ácido nucleico, o una mezcla de los mismos.

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

La expresión "ácido nucleico mutado" tal como se usa en el presente documento significa un ácido nucleico en el que se ha producido una mutación. El término "mutación" tal como se usa en el presente documento significa un

cambio en la secuencia de un ácido nucleico tal como ADN y ARN, e incluye una sustitución, inserción, deleción, inversión, duplicación, translocación de bases y similares utilizados en genética y similares. La región de la mutación en un ácido nucleico mutado no se limita a una región transcripcional, sino que incluye una región reguladora tal como un promotor que se requiere para la expresión génica. En este sentido, la mutación en un ácido nucleico mutado no requiere un cambio funcional. La "mutación" incluye mutaciones congénitas y adquiridas.

El término "sitio diana" tal como se usa en el presente documento significa un sitio al que una sonda hibrida en una secuencia de nucleótidos presente en una muestra de ácido nucleico. La sonda de hibridación no es necesario que contenga un nucleótido fotosensible. La hibridación entre la secuencia de nucleótidos y la sonda significa que la sonda hibrida con la secuencia de nucleótidos longitud completa o una parte. La expresión "nucleótido diana", tal como se usa en el presente documento, significa un sitio que contiene una secuencia de nucleótidos a la que se une un nucleótido fotosensible, y con el cual se fotoacopla. El término "fotoacoplamiento", tal como se usa en el presente documento, significa que una sonda que contiene un nucleótido fotosensible se une covalentemente a un nucleótido diana. Se sabe que hay una pluralidad de tipos de enlaces covalentes formados, dependiendo del tipo de nucleótido fotosensible, y el tipo de enlace covalente no está limitado. Más particularmente, tanto un caso en el que se forma un enlace covalente de tipo reticulante como un caso en el que se forma un tipo de ligadura pueden incluirse en la presente invención.

El nucleótido fotosensible no está limitado, siempre que tenga propiedades para reaccionar con la luz y para acoplarse con otro nucleótido formando un enlace covalente. Por ejemplo, se pueden usar nucleótidos de fórmulas I a VII descritas a continuación. Los nucleótidos fotosensibles de las fórmulas I a VII que se describen a continuación se pueden unir covalentemente a una base de pirimidina. No es limitado, siempre que pueda unirse covalentemente a los nucleótidos fotosensibles. Como una base que forma un doble enlace carbono-carbono, cuando es una sustancia natural, preferentemente, una secuencia que contiene citosina, timina, uracilo o similar puede ser un nucleótido diana. El nucleótido diana puede existir en el sitio diana, o se puede diseñar de modo que exista en una sonda distinta de la sonda de fotoacoplamiento utilizada en la presente invención.

El término "sitio objetivo" tal como se usa en el presente documento significa un sitio en el que existe una base con mutación en un ácido nucleico mutado, y un sitio para analizar, incluyendo un ácido nucleico de tipo silvestre, por el procedimiento de análisis de genes en la presente invención. Por ejemplo, cuando se ha producido una sustitución de base, el sitio objetivo se corresponde con la base sustituida tanto en un ácido nucleico de tipo silvestre como en un ácido nucleico mutado. Cuando se ha producido una inserción, el sitio objetivo se corresponde con la base insertada en un ácido nucleico mutado, y se corresponde con el sitio en el cual la base se ha insertado en el ácido nucleico mutado, en un ácido nucleico de tipo silvestre. Cuando se ha producido una deleción, el sitio objetivo se corresponde con el sitio desde el cual se delecciona la base en un ácido nucleico mutado, y se corresponde con la base delecionada en el ácido nucleico mutado, en un ácido nucleico de tipo silvestre. El sitio objetivo puede ser un tema final para ser analizado en la presente invención. Por ejemplo, el sitio objetivo puede ser una cadena que tiene una secuencia que codifica información genética (en adelante denominada cadena sentido) o una cadena que tiene una secuencia complementaria a la cadena sentido (en adelante denominada cadena antisentido). El sitio objetivo puede incluir un cambio en una secuencia de nucleótidos en una secuencia que no está directamente involucrada en la información genética.

La secuencia de nucleótidos de la sonda de fotoacoplamiento, y las posiciones y números de los nucleótidos fotosensibles no están limitados, siempre que puedan hibridar específicamente con parte o la totalidad del sitio diana.

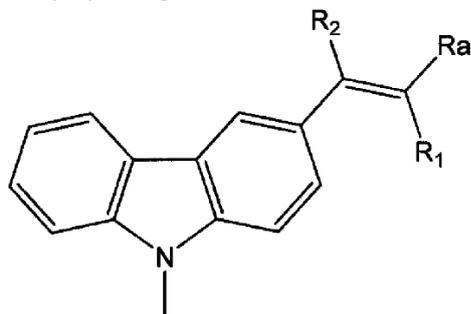
Dependiendo de las condiciones, tales como una posición mutada, el tipo de base y la longitud de la sonda de fotoacoplamiento, la sonda de fotoacoplamiento puede estar diseñada para que el sitio diana coincida con el sitio objetivo, o para que el sitio diana se establezca en un sitio diferente del sitio objetivo. Cuando el sitio diana coincide con el sitio objetivo, parte del sitio puede superponerse o puede superponerse todo el sitio.

El nucleótido fotosensible que se puede usar en la presente invención no está limitado, siempre que se pueda acoplar con el nucleótido diana mediante fotoirradiación.

Por ejemplo, se pueden usar derivados de psoralenos (Chang, E. y col. Biochemistry 1991, 30, 8283), derivados de aminopurina (JP 2001-206896 A) o 4-tiouracilo. Como los derivados de psoraleno tienen propiedades que reaccionan específicamente con la timina en la secuencia de nucleótidos 5'-AT-3', y los derivados de aminopurina no dependen de la secuencia, pero son específicos de citidina, la aplicación de estos derivados es limitada y, por lo tanto, son preferibles los siguientes nucleótidos fotosensibles sin tales limitaciones.

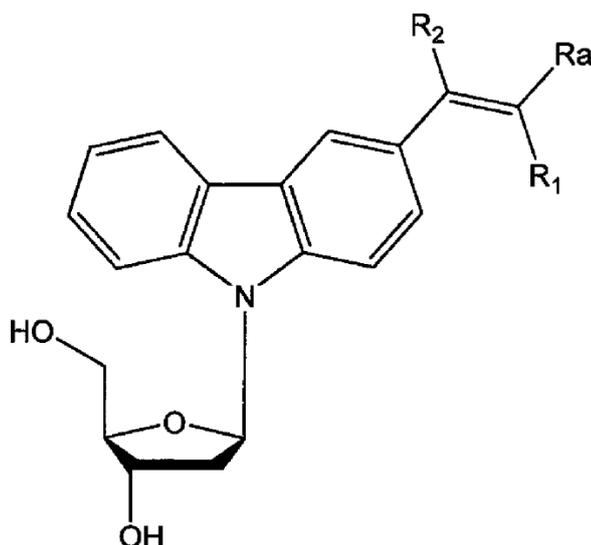
Los primeros nucleótidos fotosensibles preferibles son los que tienen, como el resto base, el grupo de fórmula I:

[Comp. quím. 1]



- 5 en el que Ra es un grupo ciano, un grupo amida, un grupo carboxilo, un grupo alcóxicarbonilo C₂-C₇, o un átomo de hidrógeno, y R₁ y R₂ son independientemente un grupo ciano, un grupo amida, un grupo carboxilo, un grupo alcóxicarbonilo C₂-C₇ o un átomo de hidrógeno (Org. Lett., Vol. 10, N.º 15, 2008, JP 2009-254279 A). En el caso en el que un ácido nucleico unido al mismo es ADN, el grupo carbazolilo sustituido de fórmula I está unido al átomo de carbono (C) en la posición 1 de 2-desoxirribosa en la posición β, tal como se muestra en la fórmula I(a):

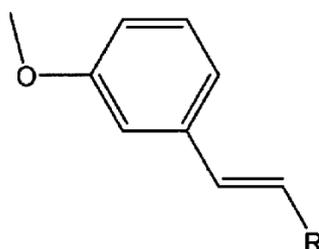
[Comp. quím. 2]



Ejemplos concretos de los primeros nucleótidos fotosensibles incluyen 3-cianovinilcarbazol-1'-β-desoxirribósido (CNVK).

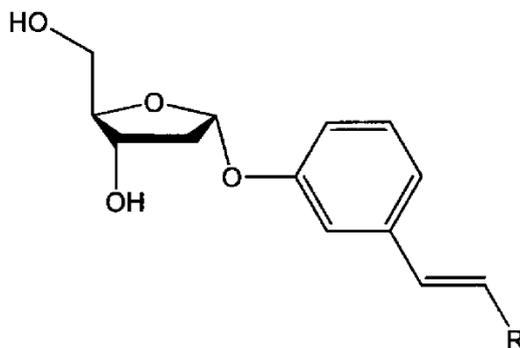
- 10 Los segundos nucleótidos fotosensibles preferibles son los que tienen el grupo de fórmula II:

[Comp. quím. 3]



- 15 en la que R es -CN, -CONR¹R², o -COOR³, R¹ a R³ son independientemente un átomo de hidrógeno o un grupo alquilo C_nH_{2n+1} (n≥1), y el límite superior de n no está limitado, pero puede ser, por ejemplo, de 1 a 7, preferentemente de 1 a 5 (Organic & Biomolecular Chemistry 2007, 5, 2583, Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters 15 (2005) 1299-1301 y JP 2005-348645 A). En el caso en el que un ácido nucleico unido al mismo es ADN, el grupo fenoxi sustituido de fórmula II está unido al átomo de carbono (C) en la posición 1 de 2-desoxirribosa en la posición α, tal como se muestra en la fórmula II(a):

[Comp. quím. 4]

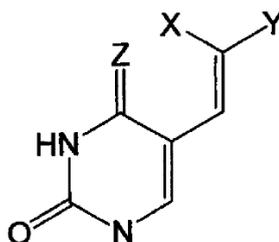


R es preferentemente -CN, -COOH, o -COOMe, y más preferentemente -COOH o -COOMe.

5 Los grupos de fórmula I y fórmula II imparten propiedades de fotoacoplamiento al ácido nucleico. Las propiedades de fotoacoplamiento se pueden impartir a ADN y ARN, así como a análogos de nucleótidos. Estos nucleótidos fotosensibles se pueden preparar de manera similar a un procedimiento convencional para producir ácido nucleico.

En una realización preferente de la presente invención, los nucleótidos fotosensibles tienen, como el resto base, el grupo de fórmula III:

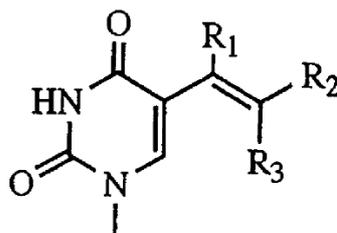
[Comp. quím. 5]



10 en el que Z representa O o NH; al menos uno de X e Y representa un grupo de extracción de electrones seleccionado del grupo que consiste en un grupo carboxilo, un grupo alcóxicarbonilo inferior, un grupo amida sustituido y un grupo ciano; y el resto de X e Y representa un átomo de hidrógeno. El grupo alquilo en el grupo alcóxicarbonilo puede ejemplificarse por un grupo alquilo inferior que tiene de 1 a 10 átomos de carbono, preferentemente de 1 a 5 átomos de carbono. Los dos sustituyentes X e Y pueden ser grupos de extracción de electrones idénticos o diferentes al mismo tiempo. Como alternativa, solo uno de los sustituyentes X e Y puede ser un grupo de extracción de electrones, mientras que el otro puede ser un átomo de hidrógeno. En la Fórmula III, es preferible que Z sea O; X es un átomo de hidrógeno; e Y es un grupo carboxilo, un grupo alcóxicarbonilo inferior, un grupo amida sustituido o un grupo ciano. Como un resto base particularmente preferido, se pueden mencionar 5-vinil-2'-desoxiuridina y 5-carboxivinil-2'-desoxiuridina. Se prefiere particularmente la 5-carboxivinil-2'-desoxiuridina.

En otra realización preferida, los nucleótidos fotosensibles tienen, como el resto base, el grupo de fórmula IV:

[Comp. quím. 6]



20 en el que R₁ es un átomo de hidrógeno; al menos uno de R₂ y R₃ representa un grupo seleccionado del grupo que consiste en un grupo carboxilo, un grupo alcóxicarbonilo inferior, un grupo alqueno inferior, un grupo alquilo

inferior, un grupo amida sustituido, un grupo amida, un grupo ciano y un átomo de hidrógeno; y el resto de R₂ y R₃ representa un átomo de hidrógeno o un grupo ciano.

Al menos uno de R₂ y R₃ es preferentemente un grupo carboxilo, mientras que se prefiere una combinación de un grupo carboxilo y un átomo de hidrógeno como la combinación de R₂ y R₃.

5 Al menos uno de R₂ y R₃ es preferentemente un grupo alcóxicarbonilo inferior, y el resto alquilo en el grupo alcóxicarbonilo inferior se puede ejemplificar por alquilo inferior que tiene de 1 a 10 átomos de carbono, preferentemente, de 1 a 5 átomos de carbono, más preferentemente, de 1 a 3 átomos de carbono, incluso más preferentemente, de 1 a 2 átomos de carbono, y en particular, preferentemente un átomo de carbono. Es decir, los ejemplos preferidos del grupo alcóxicarbonilo inferior incluyen un grupo metóxicarbonilo, un grupo etóxicarbonilo, un grupo propóxicarbonilo, un grupo butóxicarbonilo y similares. Un grupo metóxicarbonilo, un grupo etóxicarbonilo y un grupo propóxicarbonilo son más preferidos; y un grupo metóxicarbonilo y un grupo etóxicarbonilo son aún más preferidos; y se prefiere particularmente un grupo metóxicarbonilo. Una combinación de un grupo alcóxicarbonilo inferior y un átomo de hidrógeno, particularmente una combinación de un grupo metóxicarbonilo y un átomo de hidrógeno se prefieren como la combinación de R₂ y R₃.

15 Al menos uno de R₂ y R₃ es preferentemente un grupo alquénilo inferior, y el grupo alquénilo inferior se puede ejemplificar por un grupo alquénilo inferior que tiene de 2 a 10 átomos de carbono, preferentemente de 2 a 5, átomos de carbono, más preferentemente de 2 a 3 átomos de carbono, y particularmente preferentemente 2 átomos de carbono. Una combinación de un grupo alquénilo inferior y un átomo de hidrógeno, particularmente una combinación de un grupo vinilo y un átomo de hidrógeno se prefieren como la combinación de R₂ y R₃.

20 Al menos uno de R₂ y R₃ es preferentemente un grupo alquínilo inferior, y el grupo alquínilo inferior se puede ejemplificar por un grupo alquénilo inferior que tiene de 2 a 10 átomos de carbono, preferentemente de 2 a 5, átomos de carbono, más preferentemente de 2 a 3 átomos de carbono, y particularmente preferentemente 2 átomos de carbono. Una combinación de un grupo alquínilo inferior y un átomo de hidrógeno, particularmente una combinación de un grupo etínilo y un átomo de hidrógeno se prefieren como la combinación de R₂ y R₃.

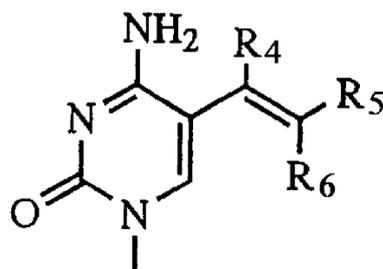
25 Al menos uno de R₂ y R₃ es preferentemente amida sustituida, y la amida sustituida puede ejemplificarse por amida monosustituida, N-sustituida. Los ejemplos preferidos de los mismos incluyen N-alquilamida y N-aminoalquilamida. Dicha N-alquilamida o N-aminoalquilamida es preferentemente un compuesto que tiene de 1 a 10 átomos de carbono, preferentemente, de 1 a 5 átomos de carbono, más preferentemente de 1 a 3 átomos de carbono, y, en particular, preferentemente 3 átomos de carbono, y se prefiere particularmente la N-aminoalquilamida. Una combinación de amida sustituida y un átomo de hidrógeno, particularmente una combinación de N-amino(alquilo C1-C3)amida y un átomo de hidrógeno se prefieren como la combinación de R₂ y R₃.

35 Al menos uno de R₂ y R₃ es preferentemente un grupo amida, y se prefiere una combinación de un grupo amida y un átomo de hidrógeno como la combinación de R₂ y R₃. Al menos uno de R₂ y R₃ es preferentemente un grupo ciano, y se prefiere una combinación de un grupo ciano y un grupo ciano, y una combinación de un grupo ciano y un átomo de hidrógeno como la combinación de R₂ y R₃.

Al menos uno de R₂ y R₃ es preferentemente un átomo de hidrógeno, y una combinación que incluye al menos un átomo de hidrógeno, y se prefiere una combinación de un átomo de hidrógeno y un átomo de hidrógeno como la combinación de R₂ y R₃.

En todavía otra realización preferida, los nucleótidos fotosensibles tienen, como el resto base, el grupo de fórmula V:

[Comp. quím. 7]



40 en el que R₄ es un átomo de hidrógeno o un grupo alquilo menor; al menos uno de R₅ y R₆ representa un grupo seleccionado del grupo que consiste en un grupo carboxilo, un grupo alcóxicarbonilo inferior, un grupo alquénilo inferior, un grupo alquínilo inferior, un grupo amida sustituido, un grupo amida, un grupo ciano y un átomo de hidrógeno; y el resto de R₅ y R₆ representa un átomo de hidrógeno o un grupo ciano.

45 R₄ es, en particular, preferentemente un átomo de hidrógeno.

5 R_4 es preferentemente un grupo alquilo inferior, y el grupo alquilo inferior es un grupo que tiene de 1 a 5 átomos de carbono, preferentemente, de 1 a 3 átomos de carbono, más preferentemente de 1 a 2 átomos de carbono, y particularmente preferentemente un átomo de carbono. Tal grupo alquilo inferior se puede ejemplificar por un grupo metilo, un grupo etilo, un grupo propilo o similar, y se prefiere un grupo metilo y un grupo etilo, mientras que un grupo metilo es particularmente preferido.

Al menos uno de R_5 y R_6 es preferentemente un grupo carboxilo, y se prefiere una combinación de un grupo carboxilo y un átomo de hidrógeno como la combinación de R_5 y R_6 .

10 Al menos uno de R_5 y R_6 es preferentemente un grupo alcoxicarbonilo inferior, y el resto alquilo en el grupo alcoxicarbonilo inferior se puede ejemplificar por alquilo inferior que tiene de 1 a 10 átomos de carbono, preferentemente, de 1 a 5 átomos de carbono, más preferentemente, de 1 a 3 átomos de carbono, incluso más preferentemente, de 1 a 2 átomos de carbono, y en particular, preferentemente un átomo de carbono. Es decir, los ejemplos preferidos del grupo alcoxicarbonilo inferior incluyen un grupo metoxycarbonilo, un grupo etoxycarbonilo, un grupo propoxycarbonilo, un grupo butoxycarbonilo y similares. Un grupo metoxycarbonilo, un grupo etoxycarbonilo y un grupo propoxycarbonilo son más preferidos; un grupo metoxycarbonilo y un grupo etoxycarbonilo son aún más preferidos; y se prefiere particularmente un grupo metoxycarbonilo. Una combinación de un grupo alcoxicarbonilo inferior y un átomo de hidrógeno, particularmente una combinación de un grupo metoxycarbonilo y un átomo de hidrógeno se prefieren como la combinación de R_5 y R_6 .

20 Al menos uno de R_5 y R_6 es preferentemente un grupo alqueno inferior, y el grupo alqueno inferior se puede ejemplificar por un grupo alqueno inferior que tiene de 2 a 10 átomos de carbono, preferentemente de 2 a 5, átomos de carbono, más preferentemente de 2 a 3 átomos de carbono, y particularmente preferentemente 2 átomos de carbono. Una combinación de un grupo alqueno inferior y un átomo de hidrógeno, particularmente una combinación de un grupo vinilo y un átomo de hidrógeno se prefieren como la combinación de R_5 y R_6 .

25 Al menos uno de R_5 y R_6 es preferentemente un grupo alquino inferior, y el grupo alquino inferior se puede ejemplificar por un grupo alqueno inferior que tiene de 2 a 10 átomos de carbono, preferentemente de 2 a 5, átomos de carbono, más preferentemente de 2 a 3 átomos de carbono, y particularmente preferentemente 2 átomos de carbono. Una combinación de un grupo alquino inferior y un átomo de hidrógeno, particularmente una combinación de un grupo etinilo y un átomo de hidrógeno se prefieren como la combinación de R_5 y R_6 .

30 Al menos uno de R_5 y R_6 es preferentemente amida sustituida, y la amida sustituida puede ejemplificarse por amida monosustituida, N-sustituida. Los ejemplos preferidos de los mismos incluyen N-alquilamida y N-aminoalquilamida. Dicha N-alquilamida o N-aminoalquilamida es preferentemente un compuesto que tiene de 1 a 10 átomos de carbono, preferentemente, de 1 a 5 átomos de carbono, más preferentemente de 1 a 3 átomos de carbono, y, en particular, preferentemente 3 átomos de carbono, y se prefiere particularmente la N-aminoalquilamida. Una combinación de amida sustituida y un átomo de hidrógeno, particularmente una combinación de N-amino(alquilo C1-C3)amida y un átomo de hidrógeno se prefieren como la combinación de R_5 y R_6 .

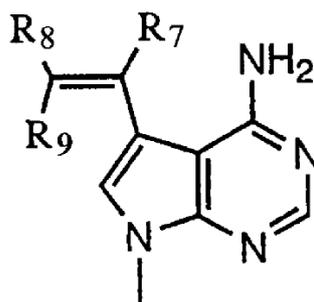
35 Al menos uno de R_5 y R_6 es preferentemente un grupo amida, y se prefiere una combinación de un grupo amida y un átomo de hidrógeno como la combinación de R_5 y R_6 .

Al menos uno de R_5 y R_6 es preferentemente un grupo ciano, y se prefiere una combinación de un grupo ciano y un grupo ciano, y una combinación de un grupo ciano y un átomo de hidrógeno como la combinación de R_5 y R_6 .

40 Al menos uno de R_5 y R_6 es preferentemente un átomo de hidrógeno, y una combinación que incluye al menos un átomo de hidrógeno, y se prefiere una combinación de un átomo de hidrógeno y un átomo de hidrógeno como la combinación de R_5 y R_6 .

En todavía otra realización preferida, los nucleótidos fotosensibles tienen, como el resto base, el grupo de fórmula VI:

[Comp. quím. 8]



en el que R_7 es un átomo de hidrógeno o un grupo alquilo menor; al menos uno de R_8 y R_9 representa un grupo seleccionado del grupo que consiste en un grupo carboxilo, un grupo alcoxycarbonilo inferior, un grupo alqueno inferior, un grupo alquino inferior, un grupo amida sustituido, un grupo amida, un grupo ciano y un átomo de hidrógeno; y el resto de R_8 y R_9 representa un átomo de hidrógeno o un grupo ciano.

5 R_7 es, en particular, preferentemente un átomo de hidrógeno.

R_7 es preferentemente un grupo alquilo inferior, y el grupo alquilo inferior es un grupo que tiene de 1 a 5 átomos de carbono, preferentemente, de 1 a 3 átomos de carbono, más preferentemente de 1 a 2 átomos de carbono, y particularmente preferentemente un átomo de carbono. Tal grupo alquilo inferior se puede ejemplificar por un grupo metilo, un grupo etilo, un grupo propilo o similar, y se prefiere un grupo metilo y un grupo etilo, mientras que un grupo metilo es particularmente preferido.

Al menos uno de R_8 y R_9 es preferentemente un grupo carboxilo, y se prefiere una combinación de un grupo carboxilo y un átomo de hidrógeno como la combinación de R_8 y R_9 .

Al menos uno de R_8 y R_9 es preferentemente un grupo alcoxycarbonilo inferior, y el resto alquilo en el grupo alcoxycarbonilo inferior se puede ejemplificar por alquilo inferior que tiene de 1 a 10 átomos de carbono, preferentemente, de 1 a 5 átomos de carbono, más preferentemente, de 1 a 3 átomos de carbono, incluso más preferentemente, de 1 a 2 átomos de carbono, y en particular, preferentemente un átomo de carbono. Es decir, los ejemplos preferidos del grupo alcoxycarbonilo inferior incluyen un grupo metoxycarbonilo, un grupo etoxycarbonilo, un grupo propoxycarbonilo, un grupo butoxycarbonilo y similares. Un grupo metoxycarbonilo, un grupo etoxycarbonilo y un grupo propoxycarbonilo son más preferidos; un grupo metoxycarbonilo y un grupo etoxycarbonilo son aún más preferidos; y se prefiere particularmente un grupo metoxycarbonilo. Una combinación de un grupo alcoxycarbonilo inferior y un átomo de hidrógeno, particularmente una combinación de un grupo metoxycarbonilo y un átomo de hidrógeno se prefieren como la combinación de R_8 y R_9 .

Al menos uno de R_8 y R_9 es preferentemente un grupo alqueno inferior, y el grupo alqueno inferior se puede ejemplificar por un grupo alqueno inferior que tiene de 2 a 10 átomos de carbono, preferentemente de 2 a 5, átomos de carbono, más preferentemente de 2 a 3 átomos de carbono, y particularmente preferentemente 2 átomos de carbono. Una combinación de un grupo alqueno inferior y un átomo de hidrógeno, particularmente una combinación de un grupo vinilo y un átomo de hidrógeno se prefieren como la combinación de R_8 y R_9 .

Al menos uno de R_8 y R_9 es preferentemente un grupo alquino inferior, y el grupo alquino inferior se puede ejemplificar por un grupo alqueno inferior que tiene de 2 a 10 átomos de carbono, preferentemente de 2 a 5, átomos de carbono, más preferentemente de 2 a 3 átomos de carbono, y particularmente preferentemente 2 átomos de carbono. Una combinación de un grupo alquino inferior y un átomo de hidrógeno, particularmente una combinación de un grupo etinilo y un átomo de hidrógeno se prefieren como la combinación de R_8 y R_9 .

Al menos uno de R_8 y R_9 es preferentemente amida sustituida, y la amida sustituida puede ejemplificarse por amida monosustituida, N-sustituida. Los ejemplos preferidos de los mismos incluyen N-alquilamida y N-aminoalquilamida. Dicha N-alquilamida o N-aminoalquilamida es preferentemente un compuesto que tiene de 1 a 10 átomos de carbono, preferentemente, de 1 a 5 átomos de carbono, más preferentemente de 1 a 3 átomos de carbono, y, en particular, preferentemente 3 átomos de carbono, y se prefiere particularmente la N-aminoalquilamida. Una combinación de amida sustituida y un átomo de hidrógeno, particularmente una combinación de N-amino(alquilo C1-C3)amida y un átomo de hidrógeno se prefieren como la combinación de R_8 y R_9 .

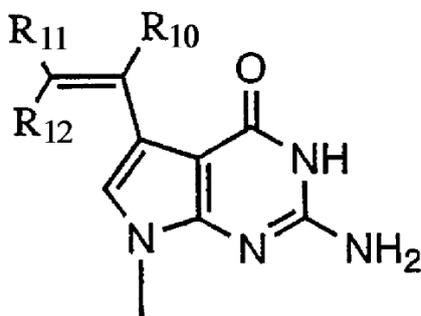
Al menos uno de R_8 y R_9 es preferentemente un grupo amida, y se prefiere una combinación de un grupo amida y un átomo de hidrógeno como la combinación de R_8 y R_9 .

Al menos uno de R_8 y R_9 es preferentemente un grupo ciano, y se prefiere una combinación de un grupo ciano y un grupo ciano, y una combinación de un grupo ciano y un átomo de hidrógeno como la combinación de R_8 y R_9 .

Al menos uno de R_8 y R_9 es preferentemente un átomo de hidrógeno, y una combinación que incluye al menos un átomo de hidrógeno, y se prefiere una combinación de un átomo de hidrógeno y un átomo de hidrógeno como la combinación de R_8 y R_9 .

En todavía otra realización preferida, los nucleótidos fotosensibles tienen, como el resto base, el grupo de fórmula VII:

[Comp. quím. 9]



en el que R₁₀ es un átomo de hidrógeno o un grupo alquilo menor; al menos uno de R₁₁ y R₁₂ representa un grupo seleccionado del grupo que consiste en un grupo carboxilo, un grupo alcocarbonilo inferior, un grupo alqueno inferior, un grupo alquínico inferior, un grupo amida sustituido, un grupo amida, un grupo ciano y un átomo de hidrógeno; y el resto de R₁₁ y R₁₂ representa un átomo de hidrógeno o un grupo ciano; tal como un resto base.

R₁₀ es, en particular, preferentemente un átomo de hidrógeno.

R₁₀ es preferentemente un grupo alquilo inferior, y el grupo alquilo inferior es un grupo que tiene de 1 a 5 átomos de carbono, preferentemente, de 1 a 3 átomos de carbono, más preferentemente de 1 a 2 átomos de carbono, y particularmente preferentemente un átomo de carbono. Tal grupo alquilo inferior se puede ejemplificar por un grupo metilo, un grupo etilo, un grupo propilo o similar, y se prefiere un grupo metilo y un grupo etilo, mientras que un grupo metilo es particularmente preferido.

Al menos uno de R₁₁ y R₁₂ es preferentemente un grupo carboxilo, y se prefiere una combinación de un grupo carboxilo y un átomo de hidrógeno como la combinación de R₁₁ y R₁₂.

Al menos uno de R₁₁ y R₁₂ es preferentemente un grupo alcocarbonilo inferior, y el resto alquilo en el grupo alcocarbonilo inferior se puede ejemplificar por alquilo inferior que tiene de 1 a 10 átomos de carbono, preferentemente, de 1 a 5 átomos de carbono, más preferentemente, de 1 a 3 átomos de carbono, incluso más preferentemente, de 1 a 2 átomos de carbono, y en particular, preferentemente un átomo de carbono. Es decir, los ejemplos preferidos del grupo alcocarbonilo inferior incluyen un grupo metoxycarbonilo, un grupo etoxycarbonilo, un grupo propoxycarbonilo, un grupo butoxycarbonilo y similares. Un grupo metoxycarbonilo, un grupo etoxycarbonilo y un grupo propoxycarbonilo son más preferidos; un grupo metoxycarbonilo y un grupo etoxycarbonilo son aún más preferidos; y se prefiere particularmente un grupo metoxycarbonilo. Una combinación de un grupo alcocarbonilo inferior y un átomo de hidrógeno, particularmente una combinación de un grupo metoxycarbonilo y un átomo de hidrógeno se prefieren como la combinación de R₁₁ y R₁₂.

Al menos uno de R₁₁ y R₁₂ es preferentemente un grupo alquénico inferior, y el grupo alquénico inferior se puede ejemplificar por un grupo alquénico inferior que tiene de 2 a 10 átomos de carbono, preferentemente de 2 a 5, átomos de carbono, más preferentemente de 2 a 3 átomos de carbono, y particularmente preferentemente 2 átomos de carbono. Una combinación de un grupo alquénico inferior y un átomo de hidrógeno, particularmente una combinación de un grupo vinilo y un átomo de hidrógeno se prefieren como la combinación de R₁₁ y R₁₂.

Al menos uno de R₁₁ y R₁₂ es preferentemente un grupo alquínico inferior, y el grupo alquínico inferior se puede ejemplificar por un grupo alquénico inferior que tiene de 2 a 10 átomos de carbono, preferentemente de 2 a 5, átomos de carbono, más preferentemente de 2 a 3 átomos de carbono, y particularmente preferentemente 2 átomos de carbono. Una combinación de un grupo alquínico inferior y un átomo de hidrógeno, particularmente una combinación de un grupo etínico y un átomo de hidrógeno se prefieren como la combinación de R₁₁ y R₁₂.

Al menos uno de R₁₁ y R₁₂ es preferentemente amida sustituida, y la amida sustituida puede ejemplificarse por amida monosustituida, N-sustituida. Los ejemplos preferidos de los mismos incluyen N-alquilamida y N-aminoalquilamida. Dicha N-alquilamida o N-aminoalquilamida es preferentemente un compuesto que tiene de 1 a 10 átomos de carbono, preferentemente, de 1 a 5 átomos de carbono, más preferentemente de 1 a 3 átomos de carbono, y, en particular, preferentemente 3 átomos de carbono, y se prefiere particularmente la N-aminoalquilamida. Una combinación de amida sustituida y un átomo de hidrógeno, y particularmente una combinación de N-amino(alquilo C1-C3)amida y un átomo de hidrógeno, se prefieren como la combinación de R₁₁ y R₁₂.

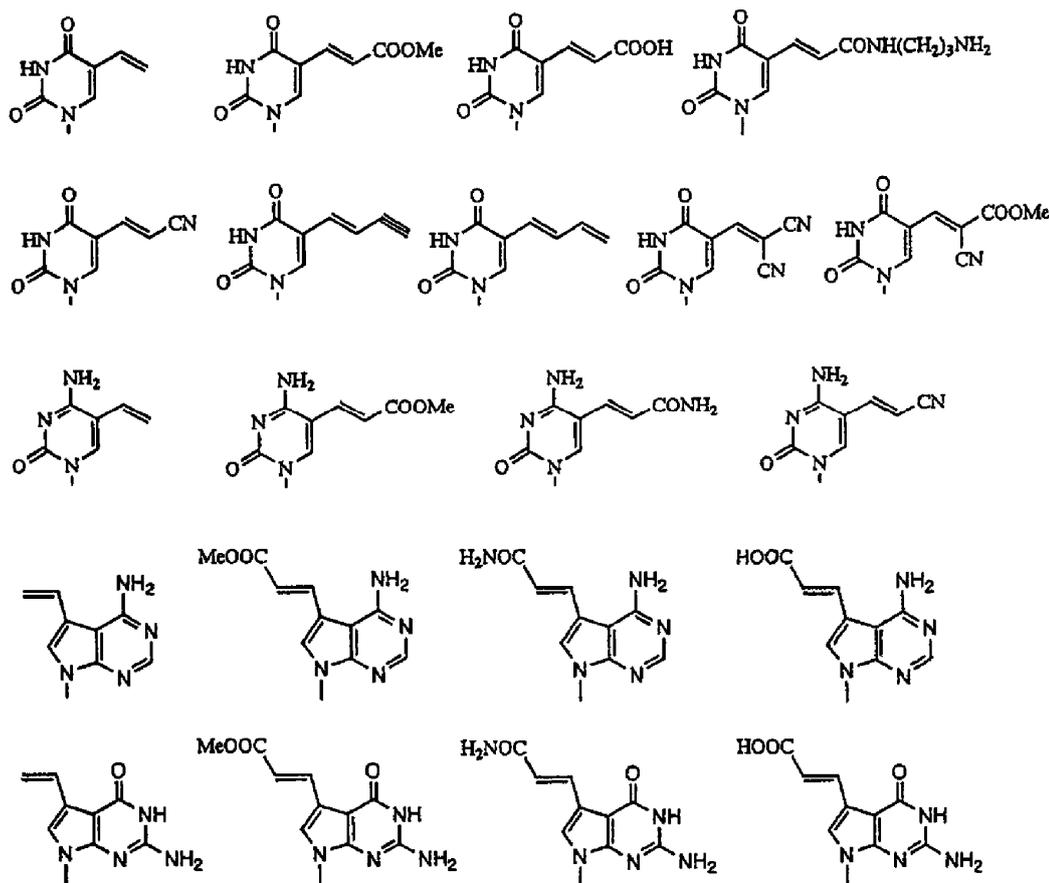
Al menos uno de R₁₁ y R₁₂ es preferentemente un grupo amida, y se prefiere una combinación de un grupo amida y un átomo de hidrógeno como la combinación de R₁₁ y R₁₂.

Al menos uno de R₁₁ y R₁₂ es preferentemente un grupo ciano, y se prefiere una combinación de un grupo ciano y un grupo ciano, y una combinación de un grupo ciano y un átomo de hidrógeno como la combinación de R₁₁ y R₁₂.

Al menos uno de R_{11} y R_{12} es preferentemente un átomo de hidrógeno, y una combinación que incluye al menos un átomo de hidrógeno, y se prefiere una combinación de un átomo de hidrógeno y un átomo de hidrógeno como la combinación de R_{11} y R_{12} .

Las fórmulas estructurales adecuadas de tales bases se ilustran como sigue. Sin embargo, las bases que se pueden usar en la presente invención no se limitan a los siguientes ejemplos.

[Comp. quím. 10]



El término "sonda", tal como se usa en el presente documento, significa un polímero que tiene dos o más subunidades de nucleósidos conocidas o subunidades de base de ácido nucleico que están unidas entre sí, e incluye ADN y/o ARN o análogos de los mismos.

- 10 El término "análogo" significa un nucleótido no natural que tiene funciones similares a las de los nucleótidos naturales, tales como desoxirribonucleótido (ADN) y ribonucleótido (ARN). Es decir, los análogos de nucleótidos pueden formar una cadena por enlaces fosodiéster, como similares a los nucleótidos, y los cebadores o una sonda hecha de análogos de nucleótidos pueden usarse para PCR o hibridación, como similar a los cebadores o una sonda hecha de nucleótidos solos.
- 15 Los ejemplos de tales análogos de nucleótidos incluyen PNA (derivado de nucleótido de poliamida), ANB (BNA, ácido nucleico en puente) y ENA (ácidos nucleicos puenteados con etileno 2'-O,4'-C), así como sus mezclas. El APN es un compuesto en el que la cadena principal que consiste en fosfato y pentosa en ADN o ARN se sustituye con una cadena de poliamida. El ANB (BNA) es un compuesto que tiene dos estructuras cíclicas en las que el átomo de oxígeno en la posición 2' del ribonucleósido está unido al átomo de carbono en la posición 4' del mismo a través de metileno.
- 20

El análogo de nucleótido no está limitado a los análogos mencionados anteriormente, siempre que la sonda sea complementaria del sitio diana y pueda hibridar de manera estable en condiciones de ensayo de hibridación. La

expresión "secuencia complementaria", tal como se usa en el presente documento, significa una secuencia que tiene una secuencia de nucleótidos capaz de formar enlaces de hidrógeno estables en condiciones de hibridación, y no es necesaria la combinación perfecta entre los nucleótidos de cada sonda.

5 La sonda que contiene un nucleótido fotosensible en la presente invención (es decir, una sonda de fotoacoplamiento) significa una sonda que contiene al menos un nucleótido fotosensible, y la sonda que contiene un nucleótido fotosensible tiene una secuencia complementaria a un sitio diana.

10 La primera sonda en la presente invención (en lo sucesivo, en ocasiones denominada sonda de fotoacoplamiento) significa una sonda de nucleótidos que tiene una secuencia complementaria a un sitio diana y que contiene un nucleótido fotosensible. La sonda de fotoacoplamiento no está limitada, siempre que contenga uno o más de los nucleótidos fotosensibles de fórmulas I a VII.

15 El procedimiento de fotoacoplamiento de la presente invención es un procedimiento de fotoacoplamiento, caracterizado porque comprende hibridar un sitio diana presente en una muestra de ácido nucleico, con una primera sonda que tiene una secuencia complementaria al sitio diana y que contiene un nucleótido fotosensible, en una solución de reacción, y llevando a cabo el fotoacoplamiento por fotoirradiación, en el que se suprime el autoensamblaje (es decir, el fotoacoplamiento en la auto-secuencia) causado por el nucleótido fotosensible contenido en la primera sonda.

20 Como la primera realización del procedimiento de fotoacoplamiento de la presente invención, un procedimiento de fotoacoplamiento de tipo reticulación, que comprende hibridar un sitio diana presente en una muestra de ácido nucleico, con una primera sonda que tiene una secuencia complementaria al sitio diana y que contiene un nucleótido fotosensible, en una solución de reacción, y llevar a cabo el fotoacoplamiento por fotoirradiación, por lo que el fotoacoplamiento se lleva a cabo entre un nucleótido diana contenido en el sitio diana y el nucleótido fotosensible contenido en la primera sonda, en el que el fotoacoplamiento en el interior de la primera sonda se suprime coexistiendo con una segunda sonda que es altamente complementaria a la primera sonda, puede ser ejemplificado.

25 De acuerdo con la primera realización, se puede mejorar la eficacia del fotoacoplamiento entre el nucleótido diana contenido en el sitio diana y la primera sonda. Por ejemplo, la segunda sonda hibrida con una primera sonda sin reaccionar que hibrida con el sitio diana, en condiciones predeterminadas de fotoacoplamiento y, como resultado, evita que la primera sonda se autoensamble para formar una estructura secundaria, y se suprime el fotoacoplamiento en el interior de la primera sonda por fotoirradiación. Como resultado, la primera sonda sin reaccionar, en la que no se produce el fotoacoplamiento con el nucleótido diana que contiene el sitio diana, mantiene su actividad de fotoacoplamiento y, por lo tanto, la eficacia del fotoacoplamiento puede mejorarse si continúa la fotoirradiación durante mucho tiempo o si se repite la fotoirradiación varias veces durante los ciclos de temperatura controlada, incluida la desnaturalización y la hibridación.

30 La expresión "ser altamente complementario" significa un estado en el que la primera sonda que contiene un nucleótido fotosensible y la segunda sonda son complementarias entre sí, y una base para ser fotoacoplada con el nucleótido fotosensible en la secuencia propia de la primera sonda bajo condiciones predeterminadas de fotoacoplamiento hibrida con la segunda sonda complementaria. La segunda sonda puede ser completamente complementaria a la primera sonda, o puede ser preferentemente complementaria con la primera sonda, pero la relación complementaria completa no es necesaria, si la segunda sonda puede hibridar con la primera sonda en condiciones predeterminadas de fotoacoplamiento. Por ejemplo, en el caso de que se puedan especificar los sitios que participan en el fotoacoplamiento en la secuencia propia, de información como el tipo, longitud y similares de la primera secuencia de sonda, entre las bases de nucleótidos que constituyen la primera sonda, las bases distintas de la base en el sitio no son necesariamente necesarias para ser complementarias.

35 Dado que el nucleótido fotosensible en la primera sonda se fotoacopla con el nucleótido diana en el sitio diana, es naturalmente necesario diseñar las sondas de modo que el nucleótido fotosensible no esté fotoacoplado con la segunda sonda. Por lo tanto, es preferible diseñar la segunda sonda de manera que no inhiba el fotoacoplamiento del nucleótido fotosensible con el nucleótido diana. Por ejemplo, se puede diseñar para suprimir el autoensamblaje de la primera sonda que contiene el nucleótido fotosensible mediante la hibridación de la segunda sonda, y para perder la capacidad de unión del nucleótido fotosensible.

40 Se conoce una base capaz de fotoacoplarse con el nucleótido fotosensible, o los expertos en la técnica pueden identificarla sin prueba y error. Por ejemplo, se sabe que los nucleótidos fotosensibles de fórmula I o fórmula II están fotoacoplados con bases de pirimidina, tales como citosina, timina y uracilo, la segunda sonda se puede diseñar y usar de modo que tenga una secuencia complementaria a las bases de pirimidina en la primera sonda. No es necesario que la segunda sonda sea complementaria de todas las bases con las cuales el nucleótido fotosensible en la primera sonda se puede fotoacoplar en su secuencia propia, y es suficiente que sea complementario de al menos una base con la que el nucleótido fotosensible en la primera sonda se puede fotoacoplar en su propia secuencia en condiciones predeterminadas de fotoacoplamiento.

45 En relación con esto, ya que se sabe que se necesitan bases consecutivas para que la segunda sonda hibride con la primera sonda, es obvio que la segunda sonda necesita complementariedad con bases distintas de una base con la

cual el nucleótido fotosensible en la primera sonda se puede fotoacoplar en su propia secuencia.

5 La segunda sonda puede suprimir el fotoacoplamiento en la secuencia propia de la primera sonda, como una secuencia contigua única, o la segunda sonda se puede usar como una pluralidad de secuencias discontinuas que tienen complementariedad con los nucleótidos capaces de fotoacoplarse con el nucleótido fotosensible contenido en la primera sonda. Tal secuencia contigua única o tal pluralidad de secuencias discontinuas se pueden diseñar y usar apropiadamente, de acuerdo con un procedimiento conocido, dependiendo de un procedimiento de análisis o condiciones de fotoacoplamiento, en vista de una secuencia de nucleótidos hibridable, su longitud de cadena, o similar.

10 El nucleótido fotosensible se puede colocar alrededor del centro de la primera sonda que contiene el nucleótido fotosensible, o en el lado terminal de la primera sonda. En el caso de que la longitud de la primera sonda disponible esté limitada en un sistema de análisis utilizado (por ejemplo, la longitud mínima de la cadena hibridable), la segunda sonda capaz de hibridar de manera estable con la primera sonda se puede diseñar colocando el nucleótido fotosensible en el lado terminal de la primera sonda.

15 En el caso en el que, cuando el nucleótido fotosensible se coloca en el extremo terminal, existe la posibilidad de que la base terminal no se pueda acercar lo suficientemente al nucleótido para ser fotoacoplado por hibridación, debido al impedimento estérico del nucleótido fotosensible y, como resultado, el nucleótido fotosensible no puede ser fotoacoplado con el sitio diana, es preferible que el nucleótido fotosensible se introduzca en el interior del extremo terminal, más preferentemente, en la posición de la segunda a la quinta base desde el extremo terminal.

20 En conocimiento técnico común convencional, se ha considerado importante para el diseño de la sonda que una sonda no debe tener ninguna secuencia complementaria que no sea el sitio diana; una sonda no debe tener ninguna secuencia complementaria en la sonda, para evitar que la sonda forme una estructura secundaria en su propia secuencia; y cuando se usan dos o más sondas, el número de secuencias complementarias entre ellas debería reducirse.

25 Sin embargo, en el procedimiento de fotoacoplado de la presente invención, con respecto a la primera sonda que tiene una secuencia complementaria al sitio diana y que contiene el nucleótido fotosensible, es un efecto sorprendente que la eficacia del fotoacoplamiento se puede mejorar mediante el uso de la segunda sonda que tiene una relación competitiva con el sitio diana y una alta complementariedad con la primera sonda.

30 Los expertos en la materia pueden determinar si la primera sonda que contiene el nucleótido fotosensible puede ser fotoacoplada en su propia secuencia, utilizando un procedimiento conocido y apropiado. Por ejemplo, se puede predecir la segunda estructura de la sonda de fotoacoplamiento, y se pueden elegir los nucleótidos que participan en el fotoacoplamiento en la secuencia propia, usando un programa informático, tal como un cálculo de bases adyacentes o un cálculo de energía libre de una estructura dada. Además, tal como se muestra a continuación en los Ejemplos, se puede examinar si se produce o no un fotoacoplamiento en la secuencia propia.

35 La segunda sonda puede contener el nucleótido fotosensible, y se puede diseñar y usar, de modo que tiene una función para suprimir el autoensamblaje como la segunda sonda, y otra función para ser fotoacoplada como la primera sonda (sonda de fotoacoplamiento) que contiene el nucleótido fotosensible.

40 La sonda que contiene el nucleótido fotosensible a veces se conoce como la primera sonda en el caso en que tiene una acción para ser fotoacoplada, o como la segunda sonda en el caso en que tiene una acción para suprimir el autoensamblaje. Por ejemplo, en el caso en que tanto una sonda de cadena sentido para un sitio diana como una sonda de cadena antisentido para el sitio diana contienen el nucleótido fotosensible, cuando la sonda de cadena sentido se considera la primera sonda, la sonda de cadena antisentido funciona como la segunda sonda, y cuando la sonda de cadena antisentido se considera la primera sonda, la sonda de cadena sentido funciona como la segunda sonda. En este caso, la segunda sonda se puede fotoacoplar de manera reticulante con el nucleótido diana en la cadena antisentido del sitio diana.

45 No se limita al procedimiento anterior, siempre que sea un procedimiento para suprimir el autoensamblaje. El procedimiento de fotoacoplamiento de la presente invención se puede usar con modificaciones apropiadas en varios procedimientos de análisis.

50 Por ejemplo, en el caso en el que la secuencia de interés es una sola cadena, tal como el ARNm, es suficiente que el nucleótido fotosensible esté contenido en al menos la primera sonda, pero en el caso en el que el sitio diana es una cadena doble, tal como ADNds, es preferible que el nucleótido fotosensible esté contenido no solo en la primera sonda, sino también en la segunda sonda. Por ejemplo, en el caso del análisis de genes en el que se detecta una secuencia mutada con alta sensibilidad al ser fotoacoplada con una secuencia de tipo silvestre, y se acompaña de una reacción de amplificación de ácido nucleico, la secuencia mutada se puede detectar e identificar con mayor sensibilidad al estar fotoacoplada tanto con la cadena sentido como con la cadena antisentido de la secuencia de tipo silvestre.

55 En el caso en que tanto la primera sonda como la segunda sonda contienen los nucleótidos fotosensibles (es decir, funcionan como las sondas de fotoacoplamiento), se puede usar la tercera sonda que tiene secuencias

complementarias a la primera sonda y/o la segunda sonda, de modo que los nucleótidos fotosensibles contenidos en la primera sonda y/o la segunda sonda no pueden ser fotoacoplados en la secuencia propia en regiones no complementarias. La tercera sonda se puede diseñar y usar de manera similar a la realización de la segunda sonda.

5 Como la segunda realización del procedimiento de fotoacoplamiento de la presente invención, un procedimiento de fotoacoplamiento de tipo ligadura, que comprende hibridar un sitio diana presente en una muestra de ácido nucleico, una primera sonda que tiene una secuencia complementaria al sitio diana y que contiene un nucleótido fotosensible, y una cuarta sonda que tiene una secuencia complementaria al sitio diana y que contiene un nucleótido diana, de modo que se coloquen adyacentes en una solución de reacción, y lleven a cabo el fotoacoplamiento por fotoirradiación entre el nucleótido diana contenido en la cuarta sonda y el nucleótido fotosensible contenido en la
10 primera sonda, en el que el fotoacoplamiento de la primera sonda se suprime coexistiendo con una segunda sonda que es altamente complementaria a la primera sonda, puede ser ejemplificado.

La segunda sonda que tiene una secuencia complementaria a la primera sonda se puede usar para suprimir el ensamblaje en la secuencia propia uniéndola con una base presente en el extremo opuesto al extremo terminal en el que se incorpora el nucleótido fotosensible.

15 Como el procedimiento de fotoacoplamiento de tipo ligadura, se puede usar el procedimiento descrito en el documento WO2007/058326. La primera realización del procedimiento de fotoacoplamiento de la presente invención se puede modificar de manera apropiada, para los expertos en la materia, para llevar a cabo fácilmente la segunda realización, excepto que el procedimiento de fotoacoplamiento es un procedimiento de tipo ligadura. En dicho procedimiento de tipo ligadura que usa el nucleótido fotosensible, la primera sonda tiene el nucleótido fotosensible
20 en su extremo terminal 3' o 5', y, además del caso en el que la primera sonda y la cuarta sonda hibridan con el sitio diana, es posible un procedimiento de uso para evitar el fotoacoplamiento por ensamblaje cuando el nucleótido fotosensible en la primera sonda se acerca espacialmente a una base de pirimidina.

En lo sucesivo, en el presente documento, se explicará el procedimiento de fotoacoplamiento de tipo ligadura.

25 La primera sonda que contiene el nucleótido fotosensible y la cuarta sonda que contiene el nucleótido diana se colocan de manera que hibridan, adyacentes entre sí, con el sitio diana predeterminado, y el nucleótido fotosensible y el nucleótido diana se colocan adyacentes entre sí para que se produzca el fotoacoplamiento por fotoirradiación.

En este caso, es preferible diseñar la primera sonda de tal manera que el nucleótido fotosensible se coloque en el extremo terminal de la primera sonda. Además, es preferible diseñar la cuarta sonda de modo que el nucleótido diana capaz de fotoacoplamiento se coloque en su extremo terminal adyacente a la primera sonda.

30 Es preferible que la primera sonda y la cuarta sonda estén adyacentes entre sí, incluso sin un espacio de una base, y una sola secuencia de nucleótidos contigua se puede formar por fotoacoplamiento cuando ambas sondas son fotoirradiadas.

35 Se forma una secuencia de nucleótidos estable adicional complementaria a la del sitio diana uniendo la primera sonda que contiene el nucleótido fotosensible con la cuarta sonda que contiene el nucleótido diana mediante fotoirradiación.

Por ejemplo, cuando se utiliza la primera sonda que contiene 5-carboxivinil-2'-desoxiuridina (denominada CVU) como nucleótido fotosensible, el CVU presenta propiedades de fotoacoplamiento a una base de pirimidina como el nucleótido diana, y forma un doble enlace carbono-carbono con el resto base de timina.

40 La secuencia de nucleótidos que se detectará como el sitio diana, la primera sonda que contiene CVU y la cuarta sonda que contiene el nucleótido diana, se mezclan e hibridan entre sí. De acuerdo con la complementariedad de las secuencias de nucleótidos, la primera sonda y la cuarta sonda se colocaron adyacentes entre sí contra el sitio diana, para que ambas sondas puedan ser fotoacopladas entre sí. Cuando la fotoirradiación se lleva a cabo en este estado, ambas sondas se fotoacoplan entre sí mediante fotorreacción, y forman una única secuencia unida por un enlace covalente entre CVU y una base de pirimidina tal como el nucleótido diana.

45 En un procedimiento de fotoacoplamiento de tipo ligadura, se pueden usar nucleótidos fotosensibles capaces de fotoacoplarse en cada extremo terminal de la primera sonda y la cuarta sonda, tal como se describió anteriormente, y los compuestos de fórmula III a VII se pueden usar como nucleótidos fotosensibles.

50 La primera realización o la segunda realización se pueden llevar a cabo solas, pero se pueden llevar a cabo en combinación de los mismos. Los ejemplos de dicha combinación incluyen un procedimiento en el que la primera sonda que contiene el nucleótido fotosensible se somete al fotoacoplamiento de tipo reticulante, y la segunda sonda que contiene el nucleótido fotosensible se somete al fotoacoplamiento de tipo ligadura; y un procedimiento en el que la primera sonda que contiene el nucleótido fotosensible se somete al fotoacoplamiento de tipo ligadura, y la segunda sonda que contiene el nucleótido fotosensible se somete al fotoacoplamiento de tipo reticulante.

55 Como la tercera realización del procedimiento de fotoacoplamiento de la presente invención, siempre que la sonda de fotoacoplamiento pueda hibridar con el sitio diana, la sonda de fotoacoplamiento en la que el nucleótido

fotosensible que provoca el autoensamblaje en la sonda de fotoacoplamiento en condiciones de fotoacoplamiento predeterminadas se reemplaza por un nucleótido capaz de no ser fotoacoplado con el nucleótido fotosensible que puede diseñarse para suprimir el fotoacoplamiento en la secuencia propia. Para evitar el fotoacoplamiento entre la sonda de la cadena sentido y la sonda de la cadena antisentido, Las sondas en las que se reemplaza con un nucleótido que no es capaz de ser fotoacoplado con el nucleótido fotosensible pueden diseñarse para suprimir el fotoacoplamiento entre las sondas. Por ejemplo, en el caso en el que el nucleótido fotosensible es CNVK, se puede llevar a cabo reemplazando una base de pirimidina con una base de purina, tal como adenina, guanina o inosina. El número de bases a sustituir se puede determinar adecuadamente de acuerdo con el número de bases de pirimidina presentes en el sitio diana o la sonda.

En el caso en el que el nucleótido fotosensible es CNVK, se puede usar artificialmente una base sintética en la que el anillo de pirimidina de citosina o timina, como una base capaz de ser fotoacoplada, se pueda convertir artificialmente. En este caso, se puede suprimir que la sonda de fotoacoplamiento esté fotoacoplada en su propia secuencia, al no causar una reacción de cicloaddición [2 + 2] por fotoirradiación. En este caso, los ejemplos de la base sintética que se puede usar incluyen 5-azo-timina, 6-azo-timina, 5-azo-citosina y 6-azo-citosina, que son bases sintéticas en las que el carbono en la posición 5 o en la posición 6 del anillo de pirimidina se reemplaza con nitrógeno.

La tercera realización se puede llevar a cabo sola, y se puede llevar a cabo en una combinación de las mismas con la primera realización y/o la segunda realización. Para los expertos en la materia, de información conocida, teniendo en cuenta qué base es la diana del nucleótido fotosensible utilizado, por qué tipo de mecanismo de reacción química se lleva a cabo el fotoacoplamiento, o similar, la base que se va a direccionar se puede sustituir o modificar, y se puede usar una base sintética apropiadamente.

El procedimiento de fotoacoplamiento de la presente invención se puede llevar a cabo en una solución de reacción que contiene una sal con acción tamponante. Los ejemplos de la sal con acción tamponante incluyen cacodilato, fosfato y una sal tris. La concentración de la sal con acción tamponante es preferentemente de 5 a 250 mmol/l. Es preferible que esté contenida una sal de metal alcalino y/o metal alcalinotérreo. Los ejemplos de metales alcalinos y/o metales alcalinotérreos incluyen cloruro de sodio y cloruro de magnesio. Se puede promover la reacción de fotoacoplamiento específico entre la sonda que contiene el nucleótido fotosensible y el sitio diana puede añadiendo un disolvente orgánico, tal como DMSO o formamida, a la solución de reacción. En relación con esto, es preferible evitar la contaminación de una sustancia sospechosa de inhibir un procedimiento de análisis de genes, que se lleva a cabo posteriormente o de manera simultánea. En particular, en el caso de que se lleve a cabo al mismo tiempo que una reacción de amplificación de ácido nucleico, se prefiere una composición de reacción adecuada para la reacción de amplificación de ácido nucleico.

En la fotoirradiación en el procedimiento de fotoacoplamiento de la presente invención, se prefiere la luz a una longitud de onda de 350-380 nm en general, preferentemente la luz que contiene una longitud de onda de 365 nm, y más preferentemente la luz láser a una longitud de onda única de 365 nm. En una realización preferida, la fotorreacción por fotoirradiación es preferentemente dentro de 1 segundo a unos pocos segundos. En relación con esto, el tiempo de fotorreacción se puede prolongar en vista de la transparencia de la luz de un recipiente y una solución.

La fotoirradiación se puede llevar a cabo una o más veces, y la eficacia del fotoacoplamiento puede aumentar repitiéndola varias veces. La fotoirradiación se puede elegir y llevar a cabo de manera adecuada por los expertos en la materia de acuerdo con un procedimiento de análisis de genes utilizado. Por ejemplo, una amplificación de un ácido nucleico de tipo silvestre se puede suprimir de manera más fiable repitiendo la fotoirradiación para cada ciclo de amplificación en un procedimiento de PCR. La luz se puede irradiar en todos los ciclos de amplificación, o la irradiación puede iniciarse o terminarse desde cualquier ciclo de amplificación.

Es importante seleccionar la longitud de onda y la salida en la fotoirradiación de modo que la sonda de fotoacoplamiento que una vez se ha fotoacoplado con el nucleótido diana no sea escindida por una reacción de equilibrio de luz por fotoirradiación. La selección de la longitud de onda y la salida en fotoirradiación se puede llevar a cabo por los expertos en la materia, sin demasiada experimentación.

De acuerdo con otra realización preferida, el ensamblaje de la sonda con el sitio diana se puede llevar a cabo de manera eficaz y rápida aumentando localmente la concentración de la sonda y, como resultado, se puede aumentar la eficacia del fotoacoplamiento.

Por ejemplo, como el ácido nucleico está cargado negativamente en una solución de reacción, su densidad sustancial se puede aumentar localmente, y se puede mejorar la eficacia del fotoacoplamiento, coexistiendo una sustancia aniónica. Se puede usar una sustancia cargada negativamente, tal como una sustancia aniónica, para promover la hibridación o mejorar la eficacia del fotoacoplamiento, en comparación con un polímero no iónico no cargado, tal como polietilenglicol o dextrano.

Como promotor de la hibridación, se puede usar una sustancia aniónica conocida tal como el ácido poliacrílico, ácido polimetacrílico, o una sal del mismo. La sustancia aniónica puede existir en una solución de reacción en la que se

realiza el fotoacoplamiento. Los expertos en la materia pueden examinar y determinar su intervalo de concentración apropiado para que no afecte a otras reacciones que no sean el fotoacoplamiento en un procedimiento de análisis de genes para analizar un gen de interés en una muestra de ácido nucleico. Por ejemplo, la concentración de poliacrilato es preferentemente de aproximadamente 0,2 al 10 % (representado por porcentaje en peso por volumen (p/v); lo mismo se aplicará de en lo sucesivo en el presente documento), y más preferentemente de aproximadamente del 0,5 al 5 %. La concentración de polimetacrilato es preferentemente de aproximadamente el 1,0 al 50 %, y más preferentemente de aproximadamente el 5 al 25 %.

El peso molecular de estos polímeros abarca un amplio intervalo, y es preferentemente de aproximadamente 5.000 a 100.000 dalton, y más preferentemente de aproximadamente 5.000 a 10.000 dalton. Con la intención de promover la hibridación en la presente invención, se pueden usar diversos polímeros de acrilato equivalentes a los mismos, por ejemplo, diversos homopolímeros o copolímeros de acrilatos que se espera que tengan propiedades promotoras de la hibridación.

Es obvio para los expertos en la materia que el procedimiento para mejorar la eficacia de hibridación es útil no solo en la hibridación de la sonda que contiene el nucleótido fotosensible con el sitio diana en condiciones de fotoacoplamiento, sino también cualquier hibridación.

En el fotoacoplamiento de la presente invención, la eficacia del fotoacoplamiento se puede mejorar al simplificar y acelerar el ensamblaje de la sonda de fotoacoplamiento con el sitio diana.

Por ejemplo, independientemente del contenido de una secuencia de nucleótidos que contiene el sitio diana en una muestra de ácido nucleico, la eficacia del fotoacoplamiento se puede mejorar aumentando la concentración de la sonda de fotoacoplamiento que contiene el nucleótido fotosensible. En este caso, la concentración de la sonda en el fotoacoplamiento es preferentemente de aproximadamente 0,1 $\mu\text{mol/l}$ o más, más preferentemente aproximadamente 1 $\mu\text{mol/l}$ o más, y lo más preferentemente aproximadamente 10 $\mu\text{mol/l}$ o más.

Como se ha descrito anteriormente, la eficacia del fotoacoplamiento se puede mejorar suprimiendo el fotoacoplamiento en la secuencia propia de la sonda de fotoacoplamiento que contiene el nucleótido fotosensible, o aumentando localmente la concentración de la sonda de fotoacoplamiento, hibridando de este modo eficazmente con el sitio diana.

El procedimiento de fotoacoplamiento de la presente invención se puede usar en un procedimiento conocido de análisis de genes para analizar un gen de interés en una muestra de ácido nucleico. Esto incluye no solo la identificación de la presencia o ausencia del gen de interés, o su secuencia, sino también la purificación o la recolección selectiva del gen, y está dentro del ámbito de las modificaciones de diseño, para los expertos en la materia.

Los ejemplos de la purificación y la recolección selectiva incluyen una etapa de pretratamiento para purificar el gen, o recolectar selectivamente ácido nucleico que contiene el nucleótido diana en un ácido nucleico. El uso en estas etapas de pretratamiento es muy eficaz en el procedimiento de análisis de genes descrito a continuación. Por lo tanto, se puede lograr un análisis preciso con alta sensibilidad en un procedimiento de análisis de genes o un procedimiento de detección de genes después del pretratamiento, y se prefiere.

Como un procedimiento de análisis de genes que se puede usar en la presente invención, se puede usar un procedimiento de detección de genes conocido o un procedimiento de amplificación de ácido nucleico conocido. Como el procedimiento de detección de genes o el procedimiento de amplificación de ácido nucleico, se conocen diversos procedimientos y, por ejemplo, un procedimiento Invader, un procedimiento Sniper, un procedimiento de PCR TaqMan, un procedimiento de sonda de hibridación, un procedimiento SNPIT, un procedimiento de pirominisecuenciación, un procedimiento de cromatografía líquida de alto rendimiento desnaturizante (DHPLC), un procedimiento MALDI-TOF/MS y un procedimiento NanoChip, se puede ejemplificar como un procedimiento de análisis rápido y de alto rendimiento. Como otro procedimiento de análisis de genes que puede usar en la presente invención, por ejemplo, en el caso de que un nucleótido mutado desconocido se considere presente en el sitio diana, la presencia o ausencia del nucleótido mutado se puede juzgar determinando la secuencia de nucleótidos de un producto amplificado de la región de detección.

Como el uso del procedimiento de detección de genes de la presente invención, un procedimiento para detectar un gen mediante hibridación de una sonda de fotoacoplamiento marcada con fluorescencia complementaria al sitio diana y que contiene el nucleótido fotosensible, con el sitio diana; el fotoacoplamiento de la sonda de fotoacoplamiento con el nucleótido diana por fotoirradiación; y detectar la fluorescencia. Para los expertos en la materia, el procedimiento de fotoacoplamiento de la presente invención se puede modificar y usar de manera apropiada, de acuerdo con el objeto del análisis de genes, y se puede usar fácilmente un procedimiento de detección de genes conocido.

La expresión "procedimiento de amplificación de ácido nucleico" tal como se usa en el presente documento significa una reacción de amplificación de un ácido nucleico molde utilizando una reacción de polimerasa conocida. Por ejemplo, el procedimiento de fotoacoplamiento de la presente invención se puede utilizar en un procedimiento conocido para suprimir la amplificación de ácido nucleico, descrito en el documento WO 2012/033190.

- 5 Como el uso del procedimiento de fotoacoplamiento de la presente invención en un procedimiento de amplificación de ácido nucleico, se puede ejemplificar un uso en un procedimiento en el que cuando se lleva a cabo un procedimiento conocido de amplificación de ácido nucleico, utilizando cebadores capaces de amplificar una secuencia de nucleótidos que se detectará que contiene el sitio diana (una secuencia de nucleótidos para la amplificación), se suprime la amplificación de una determinada secuencia de nucleótidos (por ejemplo, ácido nucleico de tipo silvestre), de acuerdo con un nucleótido mutado en un gen a detectar, considerando que solo la(s) otra(s) secuencia(s) de nucleótidos (por ejemplo, ácido nucleico mutado) se amplifica selectivamente.
- 10 Cuál de un ácido nucleico de tipo silvestre o un ácido nucleico mutado se debe seleccionar como el sujeto a suprimir de amplificación se puede seleccionar apropiadamente de acuerdo con el objeto, y por lo tanto, no está limitado. Por ejemplo, en el caso de que haya una gran desviación en la proporción de existencia en una muestra de ácido nucleico, se puede detectar la presencia o ausencia de un ácido nucleico presente en cantidades traza suprimiendo un ácido nucleico presente en grandes cantidades (por ejemplo, ácido nucleico de tipo silvestre) y amplificando selectivamente solo un ácido nucleico presente en cantidades traza (por ejemplo, un ácido nucleico mutado).
- 15 Por ejemplo, mediante el procedimiento de fotoacoplado de la presente invención, la primera sonda que contiene una secuencia complementaria al sitio diana y que contiene el nucleótido fotosensible hibrida contra un ácido nucleico de tipo silvestre para suprimir la amplificación (que contiene el sitio diana), y se fotoacopla con el nucleótido diana mediante fotoirradiación, suprimiendo así la amplificación del ácido nucleico de tipo silvestre, y solo un ácido nucleico mutado a detectar se amplifica selectivamente.
- 20 Al igual que una sonda TaqMan utilizada en un procedimiento TaqMan, las bases en una secuencia se pueden marcar con una sustancia fluorescente o un desactivador, si es necesario. Se puede usar una sonda conocida para la detección, tal como una sonda TaqMan, contra un ácido nucleico mutado no solo en la detección de un ácido nucleico de interés, sino también en la cuantificación de los mismos.
- 25 Se puede llevar a cabo el procedimiento de supresión de amplificación de un ácido nucleico específico a través del procedimiento de fotoacoplamiento de la presente invención, de manera simultánea con el otro procedimiento de amplificación de ácido nucleico, o como una etapa de pretratamiento de un procedimiento de amplificación de ácido nucleico. Para los expertos en la materia, el procedimiento de fotoacoplamiento de la presente invención se puede modificar de manera apropiada de acuerdo con el objeto del análisis de genes, y se puede usar fácilmente en un procedimiento de amplificación de genes conocido.
- 30 Los cebadores utilizados en la amplificación selectiva de ácido nucleico son capaces de amplificar una secuencia de nucleótidos para la amplificación de un ácido nucleico mutado y, al mismo tiempo, los que son capaces de amplificar una secuencia de nucleótidos para la amplificación de un ácido nucleico de tipo silvestre en el ácido nucleico de tipo silvestre antes de ser fotoacoplados con la sonda que contiene el nucleótido fotosensible.
- 35 Dado que la molécula que tiene la secuencia de tipo silvestre se fotoacopla con la sonda de fotoacoplamiento que contiene el nucleótido fotosensible por fotoirradiación, no procede una reacción de elongación de la base reticulada al lado terminal 3' y, por lo tanto, la molécula no se amplifica. Por otra parte, dado que la mayoría de las moléculas que tienen secuencias mutadas no están fotoacopladas con la sonda de fotoacoplamiento que contiene el nucleótido fotosensible por fotoirradiación, se produce una reacción de alargamiento y, como resultado, se logra una amplificación selectiva de ácido nucleico.
- 40 Los cebadores de amplificación que se pueden usar en un procedimiento de amplificación de ácido nucleico son capaces de amplificar una secuencia de nucleótidos para la amplificación que contiene un sitio diana, o dos o más sitios diana, por PCR, y son dos tipos de cebadores entre los cuales se intercala la secuencia de nucleótidos para la amplificación. Por ejemplo, los cebadores pueden ser dos tipos de cebadores que consisten en un cebador directo que tiene una secuencia de nucleótidos homóloga a la región aguas arriba de la secuencia de nucleótidos para amplificación, y un cebador inverso que tiene una secuencia de nucleótidos complementaria a la región aguas abajo de la secuencia de nucleótidos para amplificación. Cada concentración de los dos cebadores utilizados en la PCR (o una proporción de concentración) no está limitada, siempre que se pueda obtener un ácido nucleico bicatenario como producto de PCR, y es preferible que se usen a la misma concentración.
- 45
- 50 Estos cebadores que se pueden usar en PCR se pueden diseñar y sintetizar mediante un procedimiento convencional, de acuerdo con la información de secuencia de una secuencia de nucleótidos que contiene la secuencia de nucleótidos para amplificación. Estos cebadores que se pueden usar en PCR son aquellos en los que uno o más seleccionados del grupo que consiste en nucleótidos y análogos de nucleótidos están unidos por enlaces fosfodiéster. La longitud de los cebadores se determina adecuadamente en vista de los valores de Tm de los cebadores, del tipo de secuencia de nucleótidos para amplificación, y similares, y se prefiere un cebador en el que se unen de 10 a 100 moléculas.
- 55 El protocolo que incluye el tipo, la cantidad y la preparación de reactivos utilizados en la reacción de PCR, las condiciones de reacción, y similares, se lleva a cabo de acuerdo con un procedimiento convencional. La ADN polimerasa utilizada en la PCR no está limitada, siempre que sea una que se pueda usar generalmente en PCR, y se prefiera una polimerasa termoestable.

Dado que la sonda que contiene el nucleótido fotosensible inhibe una reacción de elongación de la polimerasa mediante el fotoacoplamiento con el sitio diana causado por la fotoirradiación, la sonda que contiene el nucleótido fotosensible per se no requiere resistencia a una actividad nucleasa. Por lo tanto, se puede usar una polimerasa con actividad nucleasa. Sin embargo, en el caso en el que la sonda que contiene el nucleótido fotosensible funciona como cebador y se produce una reacción de elongación de la polimerasa, es preferible que su valor de T_m se determine de modo que la sonda se retire de la molécula diana a una temperatura a la que se produce la reacción de elongación de la polimerasa, o que el extremo 3' de la sonda que contiene el nucleótido fotosensible se modifique con una sustancia que inhibe la reacción de elongación para que la sonda no funcione como cebador para la amplificación. De forma similar, en el caso de que se usen la primera sonda, la segunda sonda, la tercera sonda y la cuarta sonda para el procedimiento de fotoacoplamiento de la presente invención, es preferible que se determinen los valores de T_m de estas sondas y que los extremos terminales 3' de las mismas se modifiquen con una sustancia que inhiba la reacción de elongación, para que las sondas no funcionen como un cebador para la amplificación.

La reacción de PCR se puede llevar a cabo en una composición de reacción adecuada para una reacción de amplificación de PCR normal. Además, se puede añadir una sustancia que afecta a las condiciones de hibridación, tal como DMSO o formamida, a un líquido de reacción para promover la reacción de amplificación selectiva.

El kit de fotoacoplamiento de la presente invención está configurado para que el procedimiento de fotoacoplamiento de la presente invención se pueda llevar a cabo. Más particularmente, la primera realización del procedimiento de fotoacoplamiento de la presente invención, la segunda realización, la tercera realización y similares se llevan a cabo. La primera sonda, la segunda sonda, la tercera sonda y la cuarta sonda que constituyen el kit de fotoacoplamiento significa las mismas que la primera sonda, la segunda sonda, la tercera sonda y la cuarta sonda en el procedimiento de fotoacoplamiento de la presente invención.

El kit de fotoacoplamiento de la presente invención se define en las reivindicaciones. El primer kit de fotoacoplamiento de la presente invención contiene, al menos, la primera sonda (sonda de fotoacoplamiento) que tiene una secuencia complementaria al sitio diana en la muestra nucleica y contiene el nucleótido fotosensible capaz de fotoacoplarse con el nucleótido objetivo en el sitio diana, y la segunda sonda con alta complementariedad a la primera sonda.

La segunda sonda que contiene el nucleótido fotosensible puede estar contenida. En este caso, la segunda sonda también funciona como una sonda de fotoacoplamiento.

Además, la tercera sonda que funciona como una sonda de fotoacoplamiento y tiene una secuencia complementaria a la primera sonda y/o la segunda sonda puede estar contenida.

El segundo kit de fotoacoplamiento de la presente invención contiene, al menos, la primera sonda (sonda de fotoacoplamiento) que tiene una secuencia complementaria al sitio diana en la muestra de ácido nucleico y que contiene el nucleótido fotosensible, la cuarta sonda que contiene el nucleótido diana capaz de fotoacoplarse con el nucleótido fotosensible de la primera sonda, y la segunda sonda con alta complementariedad a la primera sonda.

La segunda sonda que contiene el nucleótido fotosensible puede estar contenida. En este caso, la segunda sonda también funciona como una sonda de fotoacoplamiento.

Además, la tercera sonda que funciona como una sonda de fotoacoplamiento y tiene una secuencia complementaria a la primera sonda y/o la segunda sonda puede estar contenida.

El tercer kit de fotoacoplamiento de la presente invención contiene, al menos, la primera sonda (sonda de fotoacoplamiento) que tiene una secuencia complementaria al sitio diana en la muestra de ácido nucleico y que contiene el nucleótido fotosensible, y la sonda de fotoacoplamiento es una sonda en la que se suprime el fotoacoplamiento en su propia secuencia reemplazando un nucleótido que se autoensambla con el nucleótido fotosensible en la sonda de fotoacoplamiento con un nucleótido incapaz del fotoacoplamiento con el nucleótido fotosensible.

El kit de fotoacoplamiento de la presente invención puede contener una solución de reacción, una enzima marcada, una polimerasa para la amplificación de ácido nucleico, cebadores para la amplificación de ácido nucleico, y similares, de acuerdo con un procedimiento de análisis de genes utilizado. Para los expertos en la materia, se pueden seleccionar componentes apropiados para diseñar el kit, de acuerdo con la composición de un kit conocido.

Ejemplos

La presente invención se ilustrará ahora adicionalmente, pero de ninguna manera se limita a los siguientes Ejemplos, en los que se usó CNVK como un nucleótido fotosensible de la sonda de fotoacoplamiento, y el sitio diana era parte de una secuencia del gen del receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGFR). Diversos cambios, mejoras y modificaciones obvias para los expertos en la materia son posibles sin alejarse del ámbito de las reivindicaciones adjuntas.

En los siguientes ejemplos, una representación mediante un código de una letra del aminoácido y el número de

posición del aminoácido indica una secuencia de tipo silvestre, y además del código de una letra del aminoácido original y el número de posición del aminoácido, una representación mediante una combinación de los mismos con el código de una letra de un aminoácido sustituido indica una secuencia mutada.

[Ejemplo 1: Confirmación del fotoacoplamiento en la secuencia propia de la sonda de fotoacoplamiento]

5 Ejemplo 1-1. Preparación de la sonda de fotoacoplamiento

Se sintetizó un oligonucleótido que consta de una secuencia de 100mero igual que parte de una región del exón 21 (ex.21) de un gen EGFR (SEQ ID NO: 1) como un molde para el fotoacoplamiento.
[SEQ ID NO: 1] oligonucleótido 100mero:

```
5' -AGCCAGGAACGTACTGGTGAAAACACCGCAG
CATGTCAAGATCACAGATTTTGGGCTGGCCAAAC
TGCTGGGTGCGGAAGAGAAAGAATACCATGCAGA
A-3' (SEQ ID NO: 1)
```

- 10 Las sondas de fotoacoplamiento que consisten en un 16mero capaz de hibridar con el oligonucleótido sintético se prepararon como sigue. Como las sondas de fotoacoplamiento, se diseñaron cuatro tipos de sondas fotorreactivas (PREP) al cambiar la posición introducida de 3-cianovinilcarbazol-1'-β-desoxirribósido (CNVK) como nucleótido fotosensible (SEQ ID NO: 2 a 5). Estas secuencias PREP se muestran en la Tabla 1. La posición del CNVK introducido en PREP está representada por "n".
- 15 El CNVK se preparó de acuerdo con el procedimiento descrito en el documento JP 2009-254279 A, y la síntesis de sondas se confió a FASMAC Co., Ltd. La fórmula estructural se muestra en la Fig. 1.

Tabla 1

PREP	Secuencia de nucleótidos
PREP a.	5'-CAGCAnTTTGGCCAGC-3' (SEQ ID NO: 2)
PREP b.	5'-CCCAGCAnTTTGGCCA-3' (SEQ ID NO: 3)
PREP c.	5'-CACCCAGCAnTTTGGC-3' (SEQ ID NO: 4)
PREP d.	5'-CGCACCCAGCAnTTTG-3' (SEQ ID NO: 5)

Ejemplo 1-2. Sonda de fotoirradiación para fotoacoplamiento

- 20 Los PREP sintetizados en el Ejemplo 1-1 se disolvieron en TE a una concentración de 100 μmol/l, y se dispensaron por separado 200 pmoles de cada solución en tubos de 0,2 ml. Cada muestra se sometió a fotoirradiación en las siguientes condiciones. La fotoirradiación a una longitud de onda de fotoacoplamiento de 365 nm se llevó a cabo usando un iluminador UV-LED (ZUV-C30H: Omron Corporation), y la fotoirradiación a una longitud de onda de escisión de 312 nm se llevó a cabo utilizando un transiluminador UV (Funakoshi Co., Ltd.).

- 25 Condición 1: Sin irradiación con luz
Cada PREP no fue sometido a fotoirradiación.
Condición 2: fotoacoplamiento por fotoirradiación
Cada PREP se irradió con luz a 365 nm a temperatura ambiente durante 1 minuto.
Condición 3: fotoacoplamiento por fotoirradiación, y escisión del fotoacoplamiento por fotoirradiación
30 Cada PREP que había sido fotoirradiado bajo la condición 2 se irradió con luz a 312 nm a temperatura ambiente durante 5 minutos.

Ejemplo 1-3. Evaluación por electroforesis

- Para observar la influencia de la foto-irradiación, cada PREP tratado en las condiciones descritas en el Ejemplo 1-2. se diluyó a 10 μmol/l con agua estéril, y se usó MultiNA (Shimadzu Corporation) para llevar a cabo la electroforesis en microplaca. Las imágenes de gel se muestran en la Fig. 2 a la Fig. 5.
- 35 En los cuatro tipos de PREP, cada banda de electroforesis se desplazó hacia el lado de bajo peso molecular mediante irradiación con luz a la longitud de onda de fotoacoplamiento. Esto sugiere que la conformación de cada PREP aparentemente cambió.
- 40 Cuando cada PREP se irradió con luz en la longitud de onda de separación de fotoacoplamiento después de la irradiación con luz en la longitud de onda de fotoacoplamiento, se confirmó que la banda desplazada hacia el lado de bajo peso molecular se devolvió a la posición original antes de la irradiación con luz a la longitud de onda de fotoacoplamiento (es decir, sin irradiación con luz). Se considera que el fotoacoplamiento que se había formado en

cada PREP en sí mismo se escindió, y el PREP volvió al estado original.

Este fenómeno se confirmó en los cuatro tipos de PREP y, por lo tanto, se considera que ocurre independientemente de la posición de fotoacoplamiento, es decir, la posición introducida de CNVK.

5 **[Ejemplo 2: Evaluación de la eficacia del fotoacoplamiento en la sonda de fotoacoplamiento tratada con fotoirradiación]**

Ejemplo 2-1. Preparación de la sonda de fotoacoplamiento

Se usaron PREPa. a PREPd. preparados en el ejemplo 1-2 como sondas de fotoacoplamiento para ser evaluadas.

Ejemplo 2-2. Reacción de fotoacoplamiento de la sonda de fotoacoplamiento

10 A tubos de 0,2 ml, se dispensaron 2 µl de 100 pmol/l de oligonucleótido sintético, como el sitio diana, se añadieron por separado 2 µl de 10 µmol/l de PREP, que se había tratado en cada condición descrita en el Ejemplo 1-2, y el volumen total se ajustó a 20 µl a una concentración final de tampón 1xPCR (10 mmol/l de Tris-HCl (pH 8,3), 50 mmol/l de KCl, 1,5 mmol/l de MgCl₂ y 0,001 % (p/v) de gelatina).

15 Las mezclas se calentaron a 95 °C durante 5 minutos, y se dejaron reposar a 50 °C durante 5 segundos, y se irradiaron a 50 °C con luz a una longitud de onda de 365 nm, usando UV-LED, durante 30 segundos. Como controles, se proporcionaron muestras no irradiadas con luz.

Ejemplo 2-3. Preparación de la solución de reacción de PCR cuantitativa y las condiciones de reacción

20 Después de añadir 80 µl de agua estéril por separado a 20 µl de cada solución de muestra (incluidas las muestras para control) preparadas en el Ejemplo 2-2, cada mezcla estaba bien mezclada. De cada mezcla, se usaron 5 µl del mismo como molde, y se llevó a cabo una reacción de PCR cuantitativa, con cebadores EGFR Ex.21F y Ex.21R usando un Light Cycler (Roche).

Se usó Light Cycler Fast Start DNA Master SYBER Green I (Roche) como reactivo de reacción de PCR. Las secuencias de los cebadores fueron las siguientes:

EGFR ex.21F: 5'-GAACGTACTGGTGAAAACACC-3'(SEQ ID NO: 6)
EGFR ex.21R: 5'-GCATGGTATTCTTTCTCTTCC-3'(SEQ ID NO: 7)

25 **Ejemplo 2-4. Evaluación de la eficacia del fotoacoplamiento**

30 Las muestras que se habían sometido al tratamiento de fotoacoplamiento en el Ejemplo 2-2 y las muestras de control que no se habían sometido al tratamiento de fotoacoplamiento se usaron como molde para llevar a cabo una reacción de PCR cuantitativa en las condiciones descritas en el Ejemplo 2-3. El sitio diana con el que PREP se fotoacopla no funciona como molde para una reacción de amplificación, porque se detiene una reacción de elongación de polimerasa en la posición reticulada por un enlace covalente. Por lo tanto, una señal fluorescente generalmente aumenta a un ciclo lento en la reacción de PCR cuantitativa, en comparación con las muestras de control sin el tratamiento de fotoacoplamiento. La cantidad del sitio diana con la que PREP está fotoacoplado se puede calcular de acuerdo con la siguiente ecuación, y se puede calcular una eficacia de fotoacoplamiento.

35 $\Delta Ct = (\text{valor de Ct del sitio diana después del tratamiento de fotoacoplamiento}) - (\text{valor de Ct del sitio diana sin el tratamiento de fotoacoplamiento})$

$$\text{Eficacia de fotoacoplamiento (\%)} = (1 - 2^{\Delta Ct}) \times 100$$

El resultado de la evaluación de la eficacia del fotoacoplamiento al sitio diana de cada PREP se muestra en la Tabla 2.

Tabla 2

Secuencia de PREP	Condiciones de irradiación UV	Eficacia de fotoacoplamiento
PREP a.	1	91,30 %
	2	21,50 %
	3	77,30 %
PREP b.	1	89,30 %
	2	0 %
	3	83,00 %
PREP c.	1	86,20 %
	2	0,70 %

	3	83,30 %
PREP d.	1	91,30 %
	2	34,00 %
	3	84,30 %

Como resultado, se confirmó en todos los PREP que la eficacia del fotoacoplamiento se redujo notablemente después de la irradiación a la longitud de onda del fotoacoplamiento durante 1 minuto. Además, se confirmó que la eficacia del fotoacoplamiento reducida se recuperó mediante la irradiación a la longitud de onda de escisión durante 5 minutos, y el sitio diana era capaz del fotoacoplamiento.

5 A partir de este resultado, se considera que cuando el PREP se irradió a la longitud de onda del fotoacoplamiento, el PREP estaba fotoacoplado en su propia secuencia, y, como resultado, se perdió la capacidad de fotoacoplamiento del PREP y se redujo notablemente la eficacia del fotoacoplamiento al sitio diana.

Además, se considera que cuando el PREP en el que se produce el fotoacoplamiento en su propia secuencia se irradiaba con luz a una longitud de onda de escisión del fotoacoplamiento de 312 nm, el fotoacoplamiento formado en la secuencia propia se escindió y volvió al estado original, y por lo tanto, se recuperó la eficacia reducida del fotoacoplamiento.

Además, la desaparición y recuperación de la capacidad de fotoacoplamiento se confirmó en todos los PREP y, por lo tanto, se sugirió que el fotoacoplamiento y la escisión en la secuencia propia de PREP pueden ocurrir independientemente de la posición introducida del CNVK en el PREP.

15 Estos resultados son consistentes con los hechos de que se desplazó la banda de electroforesis después de la reacción de fotoacoplamiento, y la banda de electroforesis después de la irradiación en la longitud de onda de escisión del fotoacoplamiento se devolvió a la posición original en el Ejemplo 1.

[Ejemplo 3: Confirmación del fotoacoplamiento en la secuencia propia de la sonda de fotoacoplamiento que consiste en una base de purina sola]

20 Los PREP que consisten en bases de purina, que no eran capaces de fotoacoplarse con el CNVK, un nucleótido fotosensible, se sintetizaron, y se confirmó que no se formó el fotoacoplamiento en la secuencia propia de cada PREP sintetizado, incluso cuando se irradiaba con luz a la longitud de onda de fotoacoplamiento.

Ejemplo 3-1. Preparación de la sonda de fotoacoplamiento

25 Como sondas de fotoacoplamiento, se prepararon los siguientes tres PREP que consisten solo en bases de purina, incluyendo adenina (A) y guanina (G). Las secuencias de los PREP sintetizados se muestran en la Tabla 3. La posición introducida (X) del CNVK, un nucleótido fotosensible, y la longitud de la cadena (16mero) se armonizó entre sí.

Tabla 3

PREP	Secuencia de nucleótidos
PREP-A	5' -AAnAAAAAAAAAAAAAAAA-3' (SEQ ID NO: 8)
PREP-G	5' -GGnGGGGGGGGGGGGGG-3' (SEQ ID NO: 9)
PREP-AG	5' -AGnAGAGAGAGAGAGA-3' (SEQ ID NO: 10)

Ejemplo 3-2. Sonda de fotoirradiación para fotoacoplamiento

30 Los PREP sintetizados en el Ejemplo 3-1 se disolvieron en TE a una concentración de 100 µmol/l, y se dispensaron por separado 200 pmoles de cada solución en tubos de 0,2 ml. Cada muestra se sometió a fotoirradiación en las siguientes condiciones. El fotoacoplamiento a una longitud de onda de fotoacoplamiento de 365 nm se llevó a cabo usando un iluminador UV-LED.

- 35
- Condición 1: Sin irradiación con luz
 - Cada PREP no fue sometido a fotoirradiación.
 - Condición 2: fotoacoplamiento por fotoirradiación
 - Cada PREP se irradió con luz a 365 nm a 4 °C durante 3 minutos.

Ejemplo 3-3. Evaluación por electroforesis

40 Para observar la influencia de la foto-irradiación, cada PREP tratado en las condiciones descritas en el Ejemplo 3-2. se diluyó a 10 µmol/l con agua estéril, y se usó MultiNA para llevar a cabo la electroforesis en microplaca. Las imágenes de gel se muestran en la Fig. 6 a la Fig. 8.

En los tres tipos de PREP, las bandas de electroforesis no fueron diferentes en movilidad, antes y después de la irradiación con luz a la longitud de onda del fotoacoplamiento. A partir de este resultado se presumió que los PREP que consisten solo en bases de purina no contenían, en sus secuencias de sonda, una base capaz de acoplarse con el CNVK, un nucleótido fotosensible y, por lo tanto, el fotoacoplamiento no se formó en su propia secuencia.

5 [Ejemplo 4: Supresión de fotoacoplamiento en secuencia propia de sonda de fotoacoplamiento que utiliza la secuencia complementaria]

Ejemplo 4-1. Preparación de la sonda de fotoacoplamiento

Las secuencias de nucleótidos correspondientes a la 790^a treonina (T790), la 858^a leucina (L858) y la 861^a leucina (L861) en la secuencia de tipo silvestre de un gen EGFR se seleccionaron como los sitios diana. Se diseñaron PREP que eran sondas de fotoacoplamiento de la cadena antisentido (cadena AS) capaces de hibridar con la cadena codificante (es decir, la cadena sentido) del gen EGFR. Además, Se diseñaron PREP que eran sondas de fotoacoplamiento de la cadena sentido (cadena S) capaces de hibridar con la cadena antisentido del gen EGFR. La complementariedad entre los PREP de tipo de cadena sentido y los PREP de tipo de cadena antisentido se cambió como las combinaciones a continuación, y el CNVK descrito en el Ejemplo 1 se dispuso en posiciones tales que las sondas correspondientes no se fotoacoplaron entre sí. Las secuencias de los PREP realmente utilizados como sondas de fotoacoplamiento y su complementariedad se muestran esquemáticamente en la Fig. 9. La cadena AS en la Fig. 9 significa que es complementaria a la cadena sentido de la secuencia del gen EGFR de tipo silvestre, y la cadena S significa que es complementaria a la cadena antisentido de la secuencia del gen EGFR de tipo silvestre.

(1) L861: Ejemplo de combinación con cadena L861 AS de baja complementariedad: 5'-CTCTTCCGCACCCAnCAG-3' (SEQ ID NO: 11) cadena L861 S : 5'-TTGGGCTGGCCAAAnCTGC-3' (SEQ ID NO: 12)

(2) T790: Ejemplo de combinación con cadena de alta complementariedad T790 AS: 5'-TGAnCTGCGTGATGAG-3' (SEQ ID NO: 13) cadena T790 S : 5'-CAnCTCATCACGCAGC-3' (SEQ ID NO: 14)

(3) L858: Ejemplo de combinación con complementariedad intermedia entre (1) y (3) cadena L858 AS: 5'-CAnTTTGGCCAGCCC-3' (SEQ ID NO: 15) cadena L858 S: 5'-CAnTTTGGGCTGGCCA-3' (SEQ ID NO: 16)

Ejemplo 4-2. Sonda de fotoirradiación para fotoacoplamiento

La fotoirradiación a las sondas de fotoacoplamiento se realizó de acuerdo con las siguientes condiciones.

Condición 1: Cadena AS, y sin irradiación con luz

Los PREP de la cadena AS capaz de hibridar con la cadena sentido del gen EGFR, sintetizados en el Ejemplo 4-1, se disolvieron por separado en TE a una concentración de 10 µmol/l.

Condición 2: Cadena AS y fotoirradiación

Cada PREP de la cadena AS preparada de manera similar a la Condición 1 se enfrió a 4 °C usando un ciclador térmico (fabricado por Applied), y se irradió con luz a 365 nm, usando un iluminador UV-LED, durante 3 minutos.

Condición 3: Cadena S y sin irradiación con luz

Los PREP de la cadena S capaz de hibridar con la cadena antisentido del gen EGFR, sintetizados en el Ejemplo 1-1, se disolvieron por separado en TE a una concentración de 10 µmol/l.

Condición 4: Cadena S y fotoirradiación

Cada PREP de la cadena S preparada de manera similar a la Condición 3 se enfrió a 4 °C usando un ciclador térmico, y se irradió con luz a 365 nm, usando un iluminador UV-LED, durante 3 minutos.

Condición 5: Cadena S y cadena AS, y sin irradiación con luz

Los PREP de la cadena AS capaces de hibridar con la cadena sentido del gen EGFR, y los PREP de la cadena S capaces de hibridar con la cadena antisentido del gen EGFR, sintetizados en el Ejemplo 4-1, se mezclaron por separado a una concentración de 10 µmol/l cada uno.

Condición 6: Cadena S y cadena AS, y fotoirradiación

Cada solución PREP mezclada de manera similar a la Condición 5 se enfrió a 4 °C usando un ciclador térmico, y se irradió con luz a 365 nm, usando un iluminador UV-LED, durante 3 minutos.

Ejemplo 4-3. Evaluación por electroforesis

Las muestras de PREP preparadas de acuerdo con las condiciones descritas en el Ejemplo 4-2. se sometieron a electroforesis en microplaca, usando MultiNA. Las imágenes de gel se muestran en la Fig. 10 a la Fig. 12. La Figura 10 es el resultado de (1) la combinación de los PREP para L861 como el sitio diana, la Fig. 11 es el resultado de (2) T790, y la Fig. 12 es el resultado de (3) L858.

(1) L861: Combinación con baja complementariedad

Con respecto a la combinación con baja complementariedad, el resultado de la electroforesis muestra un desplazamiento de banda después de la foto-irradiación, en ambos casos, del PREP solo contra la cadena sentido y el PREP solo contra la cadena antisentido, y se sugirió que se formara un fotoacoplamiento en la secuencia propia (carriles 1-4 en la Fig. 10).

En la condición 5, en la que se mezclaron el PREP contra la cadena sentido y el PREP contra la cadena antisentido, las mismas bandas, observadas en las condiciones 1 y 3, se observaron en las mismas posiciones que en el caso del PREP solo contra la cadena sentido y el caso del PREP solo contra la cadena antisentido, y se consideró que el PREP contra la cadena sentido no hibridó con el PREP contra la cadena antisentido.

- 5 En la condición 6, en la que se mezclaron y se fotoirradiaron el PREP contra la cadena sentido y el PREP contra la cadena antisentido, se observaron las mismas bandas en las mismas posiciones que las de la condición 2 en la que el PREP contra la cadena sentido se fotoirradió y en la condición 4 en la que el PREP contra la cadena antisentido se fotoirradió.

(2) T790: Combinación con alta complementariedad

- 10 Con respecto a la combinación con alta complementariedad, el resultado de la electroforesis muestra un desplazamiento de banda después de la foto-irradiación, en ambos casos, del PREP solo contra la cadena sentido y el PREP solo contra la cadena antisentido, y se sugirió que se formara un fotoacoplamiento en la secuencia propia (carriles 1-4 en la Fig. 11).

- 15 En la condición 5, en la que se mezclaron el PREP contra la cadena sentido y el PREP contra la cadena antisentido, se observó una banda en una posición diferente de las posiciones en el caso del PREP solo contra la cadena sentido en la condición 1 en la que no se realizó fotoirradiación y el caso del PREP solo contra la cadena antisentido en la condición 3 en la que la fotoirradiación no se llevó a cabo, y se presumió que el PREP contra la cadena sentido hibridó con el PREP contra la cadena antisentido.

- 20 En la condición 6, en la que se mezclaron y se fotoirradiaron el PREP contra la cadena sentido y el PREP contra la cadena antisentido, se observó la misma banda en la misma posición que antes de la fotoirradiación, pero no se observaron bandas en las posiciones en las que se detectaron las bandas cuando se formó el fotoacoplamiento en la secuencia propia por la fotoirradiación al PREP contra la cadena sentido o el PREP contra la cadena antisentido.

A partir de estos resultados, se sugirió que el fotoacoplamiento no ocurriría en la secuencia propia, cuando el PREP contra la cadena sentido se hibridó con el PREP contra la cadena antisentido durante la fotoirradiación.

- 25 (3) L858: Combinación con complementariedad intermedia entre (1) y (2)

Con respecto a la combinación con complementariedad intermedia, el resultado de la electroforesis muestra un desplazamiento de banda después de la foto-irradiación, en ambos casos, del PREP solo contra la cadena sentido y el PREP solo contra la cadena antisentido, y se sugirió que se formara un fotoacoplamiento en la secuencia propia (carriles 1-4 en la Fig. 12).

- 30 En la condición 5, en la que se mezclaron el PREP contra la cadena sentido y el PREP contra la cadena antisentido, se observó una banda en una posición diferente de las posiciones en el caso del PREP solo contra la cadena sentido en la condición 1 en la que no se realizó fotoirradiación y el caso del PREP solo contra la cadena antisentido en la condición 3 en la que la fotoirradiación no se llevó a cabo, y se presumió que el PREP contra la cadena sentido hibridó con el PREP contra la cadena antisentido.

- 35 En la condición 6, en la que se mezclaron y se fotoirradiaron el PREP contra la cadena sentido y el PREP contra la cadena antisentido, se observaron dos bandas en posiciones diferentes de la posición previa a la fotoirradiación.

- 40 La banda en el lado de bajo peso molecular (la banda inferior) se observó en la misma posición que en el caso en que se formó el fotoacoplamiento en la secuencia propia por la fotoirradiación al PREP contra la cadena sentido o el PREP contra la cadena antisentido, y por lo tanto, se consideró que la banda provenía del autoensamblaje del PREP contra la cadena sentido o el PREP contra la cadena antisentido.

- 45 La banda en el lado de alto peso molecular (la banda superior) se observó en una posición diferente de las de las bandas derivadas del autoensamblaje del PREP contra la cadena sentido o el PREP contra la cadena antisentido. A partir de este resultado se consideró que se mantenía la hibridación entre el PREP contra la cadena sentido y el PREP contra la cadena antisentido, pero una banda se desplazó por el fotoacoplamiento en la porción en la que no podía ocurrir la hibridación.

Como se ha descrito anteriormente, en el caso en el que se mezclaron y usaron los PREP con baja complementariedad, se confirmó que los PREP estaban fotoacoplados en la(s) secuencia(s) propia(s), incluso cuando se usó el PREP solo contra la cadena sentido o el PREP solo contra la cadena antisentido, o incluso cuando ambos PREP se mezclaron y usaron.

- 50 Incluso en el caso en que el PREP contra la cadena sentido y el PREP contra la cadena antisentido tenían complementariedad intermedia, se sugirió que se formó el fotoacoplamiento en la secuencia propia, si una base de pirimidina, tal como la citosina o la timina, capaz de fotoacoplarse con CNVK existía en bases no hibridadas.

A partir de estos resultados, se consideró que sería eficaz aumentar la complementariedad entre las sondas de fotoacoplamiento para suprimir el fotoacoplamiento en las secuencias propias de las sondas de fotoacoplamiento.

Además, se consideró que sería eficaz cubrir una(s) base(s) de pirimidina capaz (o capaces) de fotoacoplarse con CNVK, con su cadena complementaria, para que la(s) base(s) de pirimidina no pueda(n) acoplarse con el CNVK.

[Ejemplo 5: Confirmación de fotoacoplamiento usando sonda de fotoacoplamiento con alta complementariedad]

5 Ejemplo 5-1. Preparación de la sonda de fotoacoplamiento

Se usaron los PREP (sitio diana: T790) con alta complementariedad, preparados en el Ejemplo 4-1. (2).

Ejemplo 5-2. Preparación de fragmento de gen de tipo silvestre a partir de la región del exón 20 (ex. 20) de EGFR

10 El ADN genómico humano se preparó a partir de sangre periférica de una persona sana mediante un procedimiento convencional. El ADN resultante se usó como molde para amplificar la región de un exón 20 de EGFR (ex. 20) que comprende una secuencia de nucleótidos correspondiente a T790, usando un conjunto de cebador, ex.20F de EGFR y ex.20R de EGFR, bajo condiciones convencionales de reacción de PCR. Las secuencias del cebador utilizadas en la reacción de PCR son las siguientes:

15 EGFR ex.20F: 5'-CAGAAGCCTACGTGATGG-3' (SEQ ID NO: 17)
EGFR ex.20R: 5'-ACCTTTGCGATCTGCACAC-3' (SEQ ID NO: 18)

El producto amplificado por PCR resultante se clonó insertándolo en el vector pGEMT easy (Promega KK) de acuerdo con el protocolo adjunto al mismo.

20 Este plásmido se utilizó como molde para realizar la amplificación utilizando el conjunto de cebadores, ex.20F de EGFR y ex.20R de EGFR, bajo condiciones de reacción de PCR convencionales, y el producto amplificado se purificó usando un kit de purificación de PCR (Qiagen) para obtener un fragmento de gen lineal de tipo silvestre de ex. 20 de EGFR (SEQ ID NO: 19).

25 La concentración en peso del fragmento de gen de tipo silvestre del ex. 20 de EGFR purificado usando el kit de purificación por PCR (Qiagen) se midió usando un espectrofotómetro NanoDrop (Thermo Scientific), y se calculó el número de copias de cada fragmento de gen en vista de la longitud del fragmento amplificado. Se usó el fragmento así obtenido, como el ácido nucleico de tipo silvestre, como un molde de reacción para examinar a continuación. [SEQ ID NO: 19] fragmento de ex.20 de EGFR de tipo silvestre

5' -

CAGAAGCCTACGTGATGGCCAGCGTGGACAACCCCCACGTGTGCCGCCTGCTGGGCATCT
GCCTCACCTCCACCGTGCAGCTCATCACGCAGCTCATGCCCTTCGGCTGCCTCCTGGACT
ATGTCCGGGAACACAAAGACAATATTGGCTCCCAGTACCTGCTCAACTGGTGTGTGCAGA
TCGCAAAGGT-3' (SEQ ID NO: 19)

Ejemplo 5-3. Composición del reactivo en el momento de la reacción de fotoacoplamiento

30 A tubos de 0,2 ml, se añadió 2 µl del ácido nucleico diana (1×10^7 copia/µl) preparada en el Ejemplo 5-2., y 2 µl de cada uno de los PREP (10 µmol/l) dirigidos a las bases de nucleótidos correspondientes a T790 tal como se muestra en el Ejemplo 4-1.(2) (es decir, la cadena T790 AS (SEQ ID NO: 3) y la cadena T790 S (SEQ ID NO: 4)) y el volumen total se ajustó a 20 µl a una concentración final de tampón 1xPCR (10 mmol/l Tris-HCl (pH8,3), 50 mmol/l de KCl, 1,5 mmol/l de MgCl₂ y 0,001 % (p/v) de gelatina).

Ejemplo 5-4. Condiciones en el momento de la reacción de fotoacoplamiento

35 Con respecto a la solución de muestra de ácido nucleico preparada en el Ejemplo 5-3., se llevó a cabo la fotoirradiación a una longitud de onda de fotoacoplamiento de 365 nm en dos condiciones de temperatura. Como control, se proporcionaron muestras no irradiadas con luz.

Condición 1: Fotoirradiación a 50 °C

40 Las muestras se calentaron a 95 °C durante 3 minutos, y se dejaron reposar a 50 °C durante 30 segundos, y se irradiaron a 50 °C con luz durante 30 segundos.

Condición 2: Fotoirradiación a 4 °C

Las muestras se calentaron a 95 °C durante 3 minutos, y se dejaron reposar a 4 °C durante 1 minuto, y se irradiaron a 4 °C con luz durante 30 segundos.

Ejemplo 5-5. Confirmación de la cantidad de fotoacoplamiento mediante PCR cuantitativa

A 20 µl de cada solución de reacción después de la reacción de fotoacoplamiento realizada en el Ejemplo 5-4., se añadieron 80 µl de agua estéril y se mezclaron bien. De cada mezcla, se usaron 5 µl del mismo como molde, y se llevó a cabo una reacción de PCR cuantitativa, utilizando un Light Cycler (LC 480 Ver2: Roche).

5 La solución de reacción para PCR cuantitativa se preparó mezclando los siguientes reactivos y añadiendo agua estéril a los mismos para que el volumen líquido final por muestra se convirtiera en 25 µl. A 12,5 µl de 2xPremix Ex Taq (marca registrada) (Takara-Bio), se le añadieron 5 pmol cada uno de ex.20F de EGFR y ex.20R de EGFR, como cebadores de amplificación.

Además, se añadieron 2,5 pmoles de una sonda de detección cuyo extremo estaba marcado con fluorescencia. La secuencia de esta sonda de detección es la siguiente:

10 Sonda de ANB total: 5'-Cy5/CTT+CGGC+TGC+CTC/BHQ2-3' (SEQ ID NO: 20)

El símbolo "+" en la secuencia significa que la base que sigue al símbolo es ANB. "Cy5" representa un tinte fluorescente como un desactivador, y "BHQ2" representa un supresor de fluorescencia. La síntesis de la sonda de detección se confió a IDT.

15 La reacción de PCR cuantitativa se llevó a cabo calentando a 95 °C durante 10 segundos, y repitiendo un ciclo compuesto de reacciones a 95 °C durante 3 segundos y a 58 °C durante 30 segundos 45 veces.

Con respecto a cada muestra, la eficacia del fotoacoplamiento se evaluó mediante el valor de ΔCt , calculado por PCR cuantitativa de manera similar a la del Ejemplo 2. El resultado se muestra en la Fig. 13.

20 Cuando la fotoirradiación a una longitud de onda de fotoacoplamiento de 365 nm se llevó a cabo a 50 °C, se confirmó que el valor de ΔCt era sustancialmente constante a aproximadamente 4, incluso cuando se realizó una pluralidad de fotoirradiación (círculos rellenos en la Fig. 13). Por otra parte, cuando la fotoirradiación se realizó a 4 °C, se confirmó que el valor de ΔCt aumentaba cada vez que se realizaba la fotoirradiación (triángulos rellenos en la Fig. 13). Estos resultados indican que la cantidad de fotoacoplamiento no aumenta a 50 °C, incluso si se lleva a cabo una pluralidad de fotoirradiación, pero la cantidad de fotoacoplamiento aumenta a 4 °C cada vez que se realiza la fotoirradiación.

25 Por lo tanto, se consideró que, a 4 °C, se mantuvo una formación de hibridación entre las cadenas complementarias de PREP, y se suprimió el fotoacoplamiento en las auto-secuencias de los PREP y, por lo tanto, la cantidad de fotoacoplamiento aumentó cada vez que se realizó la fotoirradiación. Por otra parte, se consideró que, a 50 °C, no se mantuvo suficientemente la hibridación entre las cadenas complementarias de PREP, y se formó el fotoacoplamiento en las secuencias propias de los PREP, y por lo tanto, los PREP no pudieron ser fotoacoplados con el molde, y
30 luego, la cantidad de fotoacoplamiento no aumentó incluso si se realizó una pluralidad de fotoirradiación.

Es decir, para suprimir el fotoacoplamiento en la secuencia propia de una sonda de fotoacoplamiento, es necesario aumentar la complementariedad entre la sonda de fotoacoplamiento y su cadena complementaria, y llevar a cabo la fotoirradiación en condiciones de temperatura capaces de formar una hibridación suficiente entre las sondas de fotoacoplamiento complementarias (o entre una sonda de fotoacoplamiento y la segunda sonda complementaria al
35 fotoacoplamiento).

[Ejemplo 6: Examen de aditivo para promover la hibridación]

Se sugirió a partir de los resultados del Ejemplo 5 que no se podía mantener una hibridación entre sondas de fotoacoplamiento complementarias, cuando la fotoirradiación se realizó a 50 °C. Por lo tanto, se examinaron los
40 aditivos capaces de promover una hibridación entre las sondas de fotoacoplamiento. Aunque se examinaron varios aditivos, los resultados de un polímero con carga negativa (ácido poliacrílico: pAAc), que presentó altos efectos, se muestran a continuación.

Ejemplo 6-1. Preparación de la sonda de fotoacoplamiento

Se utilizaron los PREP (diana: secuencia de nucleótidos correspondiente a T790) con alta complementariedad, preparados en el ejemplo 4-1 (2).

45 Ejemplo 6-2. Preparación de fragmento de gen de tipo silvestre a partir de la región del exón 20 (ex. 20) de EGFR

Se usó sangre periférica de una persona sana como material, y el fragmento de gen de la región del ex. 20 de EGFR se preparó de manera similar a la del Ejemplo 5-2.

Ejemplo 6-3. Composición del reactivo en el momento de la reacción de fotoacoplamiento

50 A tubos de 0,2 ml, se añadió 2 µl del fragmento génico del ex. 20 de tipo silvestre (1×10^7 copia) preparada en el Ejemplo 6-2., 2 µl de cada uno de los PREP (10 µmol/l) dirigidos a las secuencia de nucleótidos correspondientes a T790 tal como se muestra en el Ejemplo 4-1.(2) (es decir, sondas de fotoacoplamiento de la cadena T790 AS (SEQ ID NO: 3) y la cadena T790 S (SEQ ID NO: 4)) y se añadieron 2 µl de ácido poliacrílico (pAAc) al 10 % en (p/p) y el

volumen total se ajustó a 20 µl a una concentración final de tampón 1xPCR (10 mmol/l Tris-HCl (pH8,3), 50 mmol/l de KCl, 1,5 mmol/l de MgCl₂ y 0,001 % (p/v) de gelatina).

Ejemplo 6-4. Condiciones en el momento de la reacción de fotoacoplamiento

5 Con respecto a la solución de muestra de ácido nucleico preparada en el Ejemplo 5-3., la fotoirradiación se llevó a cabo en las siguientes condiciones. Como control, se proporcionaron muestras no irradiadas con luz a 365 nm.

Condición 1: Una solución de muestra de ácido nucleico a la que se añadió ácido poliacrílico (pAAc) se fotoirradió a 4 °C.

Condición 2: Una solución de muestra de ácido nucleico sin ácido poliacrílico (pAAc) se fotoirradió a 4 °C.

10 Condición 3: Una solución de muestra de ácido nucleico a la que se añadió ácido poliacrílico (pAAc) se fotoirradió a 50 °C.

Condición 4: Una solución de muestra de ácido nucleico sin ácido poliacrílico (pAAc) se fotoirradió a 50 °C.

Ejemplo 6-5. Confirmación de la cantidad de fotoacoplamiento mediante PCR cuantitativa

Las muestras en las que se había llevado a cabo el fotoacoplamiento por fotoirradiación en el Ejemplo 5-4 se sometieron a PCR cuantitativa. La PCR cuantitativa se llevó a cabo en las mismas condiciones que las del Ejemplo 5.

15 Con respecto a cada muestra, la eficacia del fotoacoplamiento se evaluó mediante el valor de ΔC_t , calculado por PCR cuantitativa de manera similar a la del Ejemplo 2. El resultado del fotoacoplamiento a 4 °C se muestra en la Fig. 14, y el resultado del fotoacoplamiento a 50 °C se muestra en la Fig. 15.

20 Cuando la fotoirradiación a una longitud de onda de fotoacoplamiento de 365 nm se llevó a cabo a 4 °C, el valor de ΔC_t aumentó en un ciclo de fotoirradiación mediante la adición de pAAc (triángulos rellenos en la Fig. 14). Esto se debió a que los PREP se podían hibridar con el molde de manera más eficaz mediante la adición de pAAc, y la cantidad de fotoacoplamiento por fotoirradiación aumentó. Es decir, el pAAc promueve la hibridación del PREP con el molde.

25 Cuando la fotoirradiación a una longitud de onda de fotoacoplamiento de 365 nm se llevó a cabo a 50 °C, el valor de ΔC_t aumentó notablemente mediante la adición de pAAc (triángulos rellenos en la Fig. 15). Además del hecho de que los PREP podrían hibridar con el molde de manera más eficaz mediante la adición de pAAc, como similar al resultado de la fotoirradiación a una longitud de onda de fotoacoplamiento de 365 nm a 4 °C, se consideró que la promoción de la hibridación entre las cadenas complementarias de PREP permitió la formación de hibridación suficiente entre las cadenas complementarias del PREP y, como resultado, se suprimió el fotoacoplamiento en las secuencias propias de los PREP.

30 De estos resultados se confirmó que, con el fin de aumentar la eficacia del fotoacoplamiento, sería eficaz: mantener la hibridación entre las cadenas complementarias de la sonda de fotoacoplamiento en el momento de la fotoirradiación a una longitud de onda de fotoacoplamiento de 365 nm; suprimir el fotoacoplamiento en las secuencias propias de las sondas de fotoacoplamiento; y mantener las sondas de fotoacoplamiento en un estado capaz de fotoacoplarse.

[Ejemplo 7: Confirmación de la sensibilidad de detección de la mutación genética]

Tal como se muestra en los ejemplos mencionados anteriormente, se confirmó que la eficacia en el fotoacoplamiento a un sitio diana podría mejorar suprimiendo el fotoacoplamiento en la secuencia propia de una sonda de fotoacoplamiento. Teniendo esto en cuenta, con el fin de examinar el efecto sobre la sensibilidad de detección de la mutación genética, se usó la T790M del gen EGFR como diana para detectar la mutación genética.

40 Ejemplo 7-1. Preparación del fragmento del gen EGFR mutado

Se usó un kit basal de mutagénesis PrimeSTAR (marca registrada) (Takara-Bio) para introducir una mutación T790M en el plásmido de tipo silvestre preparado en el Ejemplo 5-2., de acuerdo con un procedimiento conocido. Es decir, la base 2639^a del gen EGFR se cambió de citosina (C) a timina (T) por el procedimiento, y el producto resultante se usó como un plásmido mutado.

45 Este plásmido se utilizó como molde para llevar a cabo una amplificación, usando el conjunto de cebadores descrito en el Ejemplo 4, ex.20F de EGFR y ex.20R de EGFR, bajo condiciones convencionales de reacción de PCR, para obtener un fragmento de gen mutado EGFR lineal. Después de que el fragmento de gen mutado resultante se purificó usando un kit de purificación por PCR, la concentración en peso del mismo se midió usando un espectrofotómetro NanoDrop, y el número de copias de cada fragmento de gen se calculó en vista de la longitud del fragmento amplificado. Se usó el fragmento así obtenido, como el ácido nucleico mutado, como molde para examinar a continuación (SEQ ID NO: 21).

50 fragmento ex.20 de EGFR mutado

5' -

CAGAAGCCTACGTGATGGCCAGCGTGGACAACCCCCACGTGTGCCGCCTGCTGGGCATCT
 GCCTCACCTCCACCGTGCAACTCATCATGCAGCTCATGCCCTTCGGCTGCCTCCTGGACT
 ATGTCCGGGAACACAAAGACAATATTGGCTCCCAGTACCTGCTCAACTGGTGTGTGCAGA
 TCGCAAAGGT-3' (SEQ ID NO: :21)

Ejemplo 7-2. Preparación de muestra mutante contaminante

- La proporción de mezcla del ácido nucleico de tipo silvestre preparada en el Ejemplo 5-2. frente al ácido nucleico mutado preparado en el Ejemplo 7-1. se cambió para preparar tres tipos de muestras (mutante al 1 %, mutante al 0,1 % y mutante al 0,01 %), que se usaron como muestras para detectar el ácido nucleico mutado. Las proporciones de mezcla usadas del ácido nucleico de tipo silvestre frente al ácido nucleico mutado se muestran en la Tabla 4. Una muestra sin el ácido nucleico mutado se consideró como una muestra de "mutante al 0 %". El tipo de mezcla se representó como el número de copia por 1 μ l.

Tabla 4

Tipo silvestre/mutado	Mutante al 1 %	Mutante al 0,1 %	Mutante al 0,01 %	Mutante al 0 %
Cantidad mixta (copias/1 μ l)	$10^7/10^5$	$10^7/10^4$	$10^7/10^3$	$10^7/0$
Proporción de mezcla	100:1	1000:1	10000:1	1:0

10 Ejemplo 7-3. Preparación de la sonda de fotoacoplamiento

Se utilizaron las sondas de fotoacoplamiento (diana: secuencia de nucleótidos correspondiente a T790) con alta complementariedad, preparadas en el ejemplo 1-1 (2).

Ejemplo 7-4. Composición del reactivo en el momento de la reacción de fotoacoplamiento

- 15 A tubos de 0,2 ml, se añadieron 2 μ l de cada uno de los PREP dirigidos a la secuencia de nucleótidos correspondiente a T790 como se muestra en el Ejemplo 4-1. (2) (es decir, la cadena T790 AS (SEQ ID NO: 13) y la cadena T790 S (SEQ ID NO: 14)) preparada en el Ejemplo 7-2., y 2 μ l de ácido poliacrílico (pAAc) al 10 % (p/p), y el volumen total se ajustó a 20 μ l a una concentración final de tampón 1xPCR (10 mmol/l Tris-HCl (pH8,3), 50 mmol/l de KCl, 1,5 mmol/l de MgCl₂ y 0,001 % (p/v) de gelatina).

Ejemplo 7-5. Condiciones en el momento de la reacción de fotoacoplamiento

- 20 Con respecto a las muestras preparadas en el Ejemplo 7-4., la fotoirradiación a una longitud de onda de fotoacoplamiento de 365 nm se llevó a cabo utilizando UV-LED. Después de calentar a 95 °C durante 3 minutos, un ciclo compuesto por mantener a 95 °C durante 30 segundos, se dejó reposar a 50 °C durante 5 segundos, y la fotoirradiación a 50 °C durante 30 segundos se repitió 10 veces.

Ejemplo 7-6. Confirmación de la cantidad de fotoacoplamiento mediante PCR cuantitativa

- 25 A 20 μ l de cada solución preparada en el Ejemplo 7-5., se añadieron 80 μ l de agua estéril y se mezclaron bien. De cada mezcla, se tomaron 5 μ l de la misma y se añadieron a la misma 45 μ l de agua estéril. De cada mezcla, se usaron 5 μ l del mismo como molde, y se llevó a cabo una reacción de PCR cuantitativa, usando un Light Cycler. La PCR cuantitativa se realizó en las mismas condiciones que las de los Ejemplos 5 y 6.

- 30 El resultado se muestra en la Fig. 16. En la Fig. 16, "a" muestra el resultado del mutante al 1 %, "b" muestra el resultado del mutante al 0,1 %, "c" muestra el resultado de mutante al 0,01 %, y "d" muestra el resultado de mutante al 0 %. El eje vertical del gráfico es el logaritmo de la intensidad de fluorescencia, y el eje horizontal es el número de ciclos de PCR. En comparación con el mutante al 0 % (solo de tipo silvestre), la señal fluorescente aumentó cuando el mutante estaba contaminado. Como resultado, se confirmó que el mutante se podía detectar de manera dependiente de la concentración, del mutante al 1 % al mutante al 0,01 %. Se considera que fue causado por el hecho de que se mejoró la eficacia del fotoacoplamiento a la secuencia de tipo silvestre al suprimir el fotoacoplamiento en las secuencias propias del PREP.

Se hizo posible amplificar de forma selectiva y eficaz un ácido nucleico mutado suprimiendo el fotoacoplamiento en la secuencia propia de una sonda de fotoacoplamiento, incluso en una proporción de existencia del mutante al 0,01 %, en la que había sido muy difícil.

- 40 Como se ha descrito anteriormente, se confirmó que se podía detectar un gen mutado con alta sensibilidad y alta precisión, de acuerdo con el presente procedimiento.

[Ejemplo 8: Evaluación del PREP introducido con inosina]**Ejemplo 8-1. Preparación de la sonda de fotoacoplamiento (PREP)**

El oligonucleótido preparado en el Ejemplo 1-1., que consiste en una secuencia 100mera igual que parte de una región del exón 21 (ex.21) de un gen EGFR, se usó como molde para ser fotoacoplado.

- 5 La posición introducida de la inosina se cambió para diseñar tres tipos de PREP (SEQ ID NO: 23-25) que consisten en 16meros capaces de hibridar con este oligonucleótido sintético. Otro PREP (SEQ ID NO: 22) al que no se introdujo inosina se diseñó como un control para la comparación. Las secuencias de estos PREP se muestran en la Tabla 5. La posición de un CNVK, un nucleótido fotosensible, introducido en el PREP está representada por "n", y la posición introducida de inosina está representada por "I".

10

Tabla 5

PREP	Secuencia de nucleótidos
PREP e.	5' -GCAnCCAGCAGTTTGG-3' (SEQ ID NO: 22)
PREP f.	5' -GCAnCCAGCAGTTIGG-3' (SEQ ID NO: 23)
PREP g.	5' -GCAnCCAGCAGTIIGG-3' (SEQ ID NO: 24)
PREP h.	5' -GCAnCCAGCAGIIIGG-3' (SEQ ID NO: 25)

Ejemplo 8-2. Fotoirradiación a PREP

- Los PREP sintetizados en el Ejemplo 8-1 se disolvieron en TE a una concentración de 100 µmol/l, y se dispensaron por separado 200 pmoles de cada solución en tubos de 0,2 ml. Cada muestra se sometió a fotoirradiación en las siguientes condiciones. La fotoirradiación a una longitud de onda formadora de pinzamientos de 365 nm se llevó a cabo utilizando un iluminador UV-LED (ZUV-C30H: Omron Corporation).

15

Condición 1: Sin irradiación con luz

Cada PREP no fue sometido a fotoirradiación.

Condición 2: Fotoirradiación para la formación de pinzamientos

Cada PREP se irradió con luz a 365 nm a 4 °C durante 3 minutos.

20 Ejemplo 8-3. Evaluación por electroforesis

Para observar la influencia de la foto-irradiación, cada PREP tratado en las condiciones descritas en el Ejemplo 8-2. se diluyó a 10 µmol/l con agua estéril, y se usó MultiNA (Shimadzu Corporation) para llevar a cabo la electroforesis en microplaca. Las imágenes de gel se muestran en la Fig. 17.

25

En el PREP en el que no se introdujo la inosina (PREP e.), y el PREP en el que se introdujo la inosina en una posición (PREP f.), la banda después de la irradiación con UV se desplazó al lado de bajo peso molecular. Por otra parte, en los PREP a los que se introdujo inosina respectivamente en dos y tres posiciones (PREP g. y PREP h.), no se observó cambio de banda después de la irradiación con UV. Esto indica que se produjo un cambio conformacional evidente de PREP por irradiación con UV en el PREP en el que no se introdujo inosina y el PREP en el que se introdujo inosina en una posición, pero el cambio conformacional de PREP se podría suprimir mediante la introducción de inosina en dos o tres posiciones.

30

A partir de estos resultados se indicó que la formación de pinzamientos en la secuencia propia del PREP podría suprimirse sustituyendo una base de pirimidina, que podría funcionar como una diana reticulada en el PREP, con una base que no funcionó como una diana reticulada, tal como la inosina.

[Ejemplo 9: Evaluación de la eficacia de formación de pinzamiento de PREP tratado con fotoirradiación]**35 Ejemplo 9-1. Preparación de la sonda de fotoacoplamiento (PREP)**

Se usaron PREP e. y PREP h. preparados en el Ejemplo 8-1. como PREP para ser evaluados.

Ejemplo 9-2. Reacción de fotoacoplamiento de PREP (reacción de formación de reivindicación)

- A tubos de 0,2 ml, se dispensaron 2 µl de 100 pmol/l de oligonucleótido sintético, tal como una secuencia de nucleótidos que tiene el sitio diana, se añadieron por separado 2 µl de 100 µmol/l de PREP, que se había tratado en cada condición descrita en el Ejemplo 8-2, y el volumen total se ajustó a 20 µl a una concentración final de tampón 1xPCR (10 mmol/l de Tris-HCl (pH 8,3), 50 mmol/l de KCl, 1,5 mmol/l de MgCl₂ y 0,001 % (p/v) de gelatina).

40

Las mezclas se calentaron a 95 °C durante 5 minutos, y se dejaron reposar a 45 °C durante 5 segundos, y se irradiaron a 45 °C con luz a una longitud de onda de 365 nm, usando UV-LED, durante 30 segundos. Como control, se proporcionaron muestras no irradiadas con luz.

Ejemplo 9-3. Preparación de la solución de reacción de PCR cuantitativa y las condiciones de reacción

Después de añadir 80 µl de agua estéril por separado a 20 µl de cada solución de muestra (incluidas las muestras para control) preparadas en el Ejemplo 9-2, cada mezcla estaba bien mezclada. De cada mezcla, se mezclaron 5 µl de la misma con 45 µl de agua estéril. De cada muestra mixta, se usaron 5 µl del mismo como molde, y se llevó a cabo una reacción de PCR cuantitativa, utilizando un Light Cycler (LC 480 Ver2: Roche).

La solución de reacción para PCR cuantitativa se preparó mezclando los siguientes reactivos y añadiendo agua estéril a los mismos para que el volumen líquido final por muestra se convirtiera en 25 µl. A 12,5 µl de 2xPremix Ex Taq (marca registrada) (Takara-Bio), se añadieron 5 pmol cada uno de ex.21F de EGFR (SEQ ID NO: 6) y ex.21R de EGFR (SEQ ID NO: 7) como cebadores de amplificación.

Además, se añadieron 2,5 pmoles de una sonda de detección cuyo extremo estaba marcado con fluorescencia. La secuencia de esta sonda de detección es la siguiente:

Sonda de ANB total: 5'-Cy5/CAGCATGT+CAAGA+TCACAGA/BHQ_2-3' (SEQ ID NO: 26)

El símbolo "+" en la secuencia significa que la base que sigue al símbolo es ANB. "Cy5" representa un tinte fluorescente, y "BHQ2" representa un supresor de fluorescencia. La síntesis de la sonda de detección se confió a IDT.

La reacción de PCR cuantitativa se llevó a cabo calentando a 95 °C durante 10 segundos, y repitiendo un ciclo compuesto de reacciones a 95 °C durante 3 segundos y a 56 °C durante 30 segundos 45 veces.

Con respecto a cada muestra, la eficiencia de formación de pinzamientos se evaluó mediante el valor de ΔC_t , calculado por PCR cuantitativa de manera similar a la del Ejemplo 2. El resultado se muestra en la Fig. 18.

Las secuencias de los cebadores son las siguientes:

EGFR ex.21F: 5'-GAACGTACTGGTGA AACACC-3' (SEQ ID NO: 6)

EGFR ex.21R: 5'-GCATGGTATTCTTCTCTTCC-3' (SEQ ID NO: 7)

Cuando se usó PREP e. al que no se introdujo inosina, se confirmó que el valor de ΔC_t era sustancialmente constante a aproximadamente 4, incluso cuando se realizó una pluralidad de fotoirradiación (triángulos en la Fig. 18). Por otra parte, cuando se usó PREP h. al que se introdujo la inosina, se confirmó que el valor de ΔC_t aumentaba cada vez que aumentaba el número de irradiación con UV (cuadrados en la Fig. 19).

En relación con esto, se considera que, en el PREP al que no se introdujo la inosina, se produjo una formación de pinzamiento en la secuencia propia del PREP y, por lo tanto, la cantidad de formación de pinzamientos del PREP en el molde no aumentó incluso cuando se realizó una pluralidad de fotoirradiaciones, mientras que en el PREP en el que se introdujo la inosina, se suprimió la formación de pinzamientos en la secuencia propia del PREP, y el PREP se convirtió en un estado capaz de formar suficientemente un pinzamiento en el molde y, por lo tanto, la cantidad de formación de pinzamientos aumentó dependiendo del número de irradiaciones con UV.

Es decir, se indicó que se podía suprimir el fotoacoplamiento en la secuencia propia del PREP, y se podía aumentar la cantidad de formación de pinzamientos del PREP, mediante la sustitución de una base diana reticulada en la secuencia propia del PREP, con una base que no funcionó como un nucleótido diana para el fotoacoplamiento, tal como la inosina.

[Ejemplo 10: Confirmación de la formación de pinzamientos usando PREP con alta complementariedad]**Ejemplo 10-1. Preparación de la sonda de fotoacoplamiento (PREP)**

La secuencia de nucleótidos correspondiente a la 861^a leucina (L861) de un gen EGFR (tipo silvestre) se seleccionó como el sitio diana. La secuencia de PREP e. diseñada en el ejemplo 8-1 se consideró como un PREP de la cadena antisentido (cadena AS), que hibridó con la cadena codificante (es decir, cadena sentido) del gen EGFR. Adicionalmente, se diseñó un PREP de la cadena sentido (cadena S), que hibridó con la cadena antisentido del gen EGFR (SEQ ID NO: 27). La posición del CNVK introducida está representada por "n".

Cadena L861 AS: 5'-GCAnCCAGCAGTTTGG-3' (SEQ ID NO: 22)

Cadena L861 S: 5'-CTGnCCAAACTGCTGG-3' (SEQ ID NO: 27)

Adicionalmente, se diseñaron los PREP en los que la complementariedad entre un PREP de la cadena sentido y un PREP de la cadena antisentido era completamente complementaria, el CNVK se colocó en una posición en la que los PREP no podían fotoacoplarse entre sí, y el nucleótido diana originalmente capaz de fotoacoplarse con CNVK de cada PREP se reemplazó con inosina. La posición del CNVK introducida está representada por "n", y la posición de inosina introducida está representada por "I".

Cadena L861 AS: 5'-GCAnCCAGCAGTITGG-3' (SEQ ID NO: 28)

Cadena L861 S: 5'-CCAACTGCTGGGIGC-3' (SEQ ID NO: 29)

Las secuencias de los PREP que realmente se usaron como sondas de pinzamiento y su complementariedad se muestran esquemáticamente en la Figura 19.

Ejemplo 10-2. Preparación de fragmento de gen de tipo silvestre en la región de exón 21 (ex.21) del EGFR

5 El ADN genómico humano se preparó a partir de sangre periférica de una persona sana mediante un procedimiento convencional. El ADN resultante se usó como molde para amplificar la región de un exón 21 de EGFR (ex. 21) que comprende una secuencia de nucleótidos correspondiente a L861, usando un conjunto de cebador, ex.21F de EGFR y ex.21R de EGFR, bajo condiciones convencionales de reacción de PCR. Las secuencias del cebador utilizadas en la reacción de PCR son las siguientes:

10 ex.21F de EGFR (fuera): 5'-GCATGAACTACTTGGAGGAC-3' (SEQ ID NO: 30)
ex.21R de EGFR (fuera): 5'-ACCTAAAGCCACCTCCTTAC-3' (SEQ ID NO: 31)

El producto amplificado por PCR resultante se clonó insertándolo en el vector pGEMT easy (Promega KK) de acuerdo con el protocolo adjunto al mismo.

15 Este plásmido se utilizó como molde para realizar la amplificación utilizando el conjunto de cebadores, ex.21F de EGFR y ex.21R de EGFR, bajo condiciones de reacción de PCR convencionales, y el producto amplificado se purificó usando un kit de purificación de PCR (Qiagen) para obtener un fragmento de gen lineal de tipo silvestre de EGFR ex. 21 (SEQ ID NO: 32).

20 La concentración en peso del fragmento de gen de tipo silvestre del ex. 21 de EGFR purificado usando el kit de purificación por PCR (Qiagen) se midió usando un espectrofotómetro NanoDrop (Thermo Scientific), y se calculó el número de copias de cada fragmento de gen en vista de la longitud del fragmento amplificado. Se usó el fragmento así obtenido, como el ácido nucleico de tipo silvestre, como un molde de reacción para examinar a continuación. [SEQ ID NO: 32] fragmento de ex.21 de EGFR de tipo silvestre

5' –
GCATGAACTACTTGGAGGACCGTTCGCTTGGTGCACCGCGACCTGGCAGCCAGGAACGTAC
TGGTGAAAACACCGCAGCATGTCAAGATCACAGATTTTGGGCTGGCCAAACTGCTGGGTG
CGGAAGAGAAAGAATACCATGCAGAAGGAGGCAAAGTAAGGAGGTGGCTTTGGT–
3' (SEQ ID NO: 32)

Ejemplo 10-3. Composición del reactivo en el momento de la reacción de fotoacoplamiento

25 A tubos de 0,2 ml, se añadió 2 µl del ácido nucleico diana (1×10^7 copia/µl) preparada en el Ejemplo 5-2., y 2 µl de cada uno de los PREP (100 µmol/l) dirigidos a las bases de nucleótidos correspondientes a L861 tal como se muestra en el Ejemplo 10-1. (es decir, la cadena L861 AS (SEQ ID NO: 28) y la cadena L861 S (SEQ ID NO: 29)) y el volumen total se ajustó a 20 µl a una concentración final de tampón 1xPCR (10 mmol/l Tris-HCl (pH8,3), 50 mmol/l de KCl, 1,5 mmol/l de MgCl₂ y 0,001 % (p/v) de gelatina).

Ejemplo 10-4. Condiciones en el momento de la reacción de fotoacoplamiento

30 Las soluciones de muestra de ácido nucleico preparadas en el Ejemplo 10-3. se calentaron a 95 °C durante 5 minutos, y se dejaron reposar a 45 °C durante 5 segundos, y se irradiaron a 45 °C con luz a una longitud de onda de 365 nm, usando UV-LED, durante 30 segundos. Como controles, se proporcionaron muestras no irradiadas con luz.

Ejemplo 10-5. Confirmación de la cantidad de pinzamiento usando PCR cuantitativa

35 A 20 µl de cada solución de reacción después de la reacción de fotoacoplamiento en el Ejemplo 10-4, se añadieron 80 µl de agua estéril y se mezclaron bien. De cada mezcla, se tomaron 5 µl de la misma y se añadieron a la misma 45 µl de agua estéril. De cada mezcla, se usaron 5 µl del mismo como molde, y se llevó a cabo una reacción de PCR cuantitativa, utilizando un Light Cycler (LC 480 Ver2: Roche).

40 La solución de reacción para PCR cuantitativa se preparó mezclando los siguientes reactivos y añadiendo agua estéril a los mismos para que el volumen líquido final por muestra se convirtiera en 25 µl. A 12,5 µl de 2xPremix Ex Taq (marca registrada) (Takara-Bio), se añadieron 5 pmol de ex.21F de EGFR y ex.21R de EGFR, como cebadores de amplificación. Además, se añadieron 2,5 pmoles de una sonda de detección cuyo extremo estaba marcado con fluorescencia. La sonda (SEQ ID NO: 26) descrita en el Ejemplo 9 se usó como sonda de detección, y la reacción de PCR cuantitativa se llevó a cabo en las mismas condiciones que las del Ejemplo 9-2.

45 Con respecto a cada muestra, la eficiencia de formación de pinzamientos se evaluó mediante el valor de ΔC_t , calculado por PCR cuantitativa de manera similar a la del Ejemplo 2. El resultado se muestra en la Fig. 20.

Con respecto al PREP diseñado por técnicas de diseño convencionales (triángulo relleno), el valor de ΔC_t se saturó en cierto lugar, incluso cuando se realizó una pluralidad de irradiaciones con UV. Por otra parte, se confirmó que cuando se usó el PREP que contenía inosina y era completamente complementario, el valor de ΔC_t podría aumentar cada vez que se llevara a cabo la irradiación con UV.

- 5 Se considera que la formación de pinzamientos en la secuencia propia de cada PREP se podría suprimir introduciendo inosina en los PREP y aumentando la complementariedad de los PREP. También se confirmó a partir de estos resultados que: mantener la hibridación entre las cadenas complementarias de PREP en el momento de la fotoirradiación a 365 nm como la longitud de onda de formación del pinzamiento; suprimir la formación de pinzamientos en la secuencia propia; y mantener los PREP en un estado capaz de formar un pinzamiento; fueron
10 eficaces para mejorar la eficiencia de formación de pinzamientos.

Aplicabilidad industrial

- La presente invención se refiere a un procedimiento para mejorar la eficacia del fotoacoplamiento, usando una sonda que contiene nucleótidos fotosensibles, y el análisis de genes se puede llevar a cabo con alta sensibilidad y alta
15 precisión. Por ejemplo, se puede usar para detectar de manera selectiva un gen mutado presente en pequeñas cantidades, mezclado con un gen de tipo silvestre presente en grandes cantidades. Adicionalmente, se puede detectar un gen diana a partir de una muestra de ácido nucleico que es difícil de detectar mediante un procedimiento de evaluación convencional, porque el gen diana está presente en pequeñas cantidades.

- Como tal análisis anterior es posible, no solo muestras con alta invasividad, como tejidos o material de biopsia extirpado por cirugía, sino también muestras en las que un ácido nucleico diana está presente en pequeñas
20 cantidades, tales como muestras de sangre, se puede manejar como muestras y, por lo tanto, la confirmación de un efecto terapéutico o inspección de monitoreo, lo cual fue difícil, se puede llevar a cabo. Esto permite la realización de medicina personalizada, aplicándolo a, por ejemplo, una detección temprana del cáncer, o evaluación de la eficacia del fármaco, tal como la susceptibilidad a los fármacos y la respuesta a los fármacos, para pacientes individuales.

- Aunque la presente invención se ha descrito con referencia a las realizaciones específicas, son posibles diversos
25 cambios y modificaciones evidentes para los expertos en la materia.

TEXTO LIBRE EN LISTADO DE SECUENCIAS

- Las secuencias de nucleótidos de SEQ ID NO: 2 a 5 de la lista de secuencias son secuencias de sonda sintetizadas artificialmente, y son respectivamente PREPa. (la sexta n es CNVK), PREPb. (la octava n es CNVK), PREPc. (la
30 décima n es CNVK) y PREPd. (la duodécima n es CNVK). Las secuencias de nucleótidos de SEQ ID NO: 8 a 10 son secuencias de sonda sintetizadas artificialmente, y son respectivamente PREP-A (la tercera n es CNVK), PREP-G (la tercera n es CNVK) y PREP-AG (la tercera n es CNVK). Las secuencias de nucleótidos de SEQ ID NO: 11 a 16 son secuencias de sonda sintetizadas artificialmente, y son respectivamente la sonda L861 AS (la decimoquinta n es CNVK), sonda L861 S (la decimocuarta n es CNVK), sonda T790 AS (la cuarta n es CNVK), sonda T790 S (la tercera n es CNVK), sonda L858 AS (la tercera n es CNVK) y sonda L858 S (la tercera n es CNVK). La secuencia de nucleótidos de la SEQ ID NO: 20 es una secuencia de sonda sintetizada artificialmente y es una sonda de ANB total (la cuarta C, la octava T y la undécima C son ANB). Las secuencias de nucleótidos de SEQ ID NO: 22 a 25 son
35 secuencias de sonda sintetizadas artificialmente, y son respectivamente PREPe. (la cuarta n es CNVK), PREPf. (la cuarta n es CNVK y la decimocuarta n es inosina), PREPg. (la cuarta n es CNVK, y la decimotercera n y la decimocuarta n son inosina) y PREPh. (la cuarta n es CNVK, y la duodécima a la decimocuarta n son inosina). La secuencia de nucleótidos de la SEQ ID NO: 26 es una secuencia de sonda sintetizada artificialmente, y es una sonda de ANB total (la novena C y la decimocuarta T son ANB). Las secuencias de nucleótidos de SEQ ID NO: 27 a 29 son secuencias de sonda sintetizadas artificialmente, y son respectivamente la sonda L861 S (la cuarta n es CNVK), sonda T861 AS (la cuarta n es CNVK y la decimotercera n es inosina), y la sonda T861 S (la quinta n es CNVK y la decimocuarta n es inosina).

45 LISTADO DE SECUENCIAS

<110> Mitsubishi Chemical Medience Corporation

<120> Procedimiento para el fotoacoplamiento con una sonda que comprende nucleótidos fotosensibles

<130> MCM-921

<150> JP 2012-161834

50 <151> 20/07/2012

<150> JP 2012-270614

<151> 11/12/2012

<160> 32

<170> PatentIn versión 3.5

ES 2 805 794 T3

<210> 1
 <211> 100
 <212> ADN
 <213> *Homo sapiens*

5 <400> 1
 agccaggaac gtactggtga aaacaccgca gcatgtcaag atcacagatt ttgggctggc 60
 caaactgctg ggtgcggaag agaaagaata ccatgcagaa 100

<210> 2
 <211> 16
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

10 <220>
 <223> sonda PREPa.

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (6)..(6)
 <223> "n" es CNVK

15 <400> 2
 cagcanttg gccagc 16

<210> 3
 <211> 16
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

20 <220>
 <223> sonda PREPb.

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (8)..(8)
 <223> "n" es CNVK

25 <400> 3
 cccagcantt tggcca 16

30 <210> 4
 <211> 16
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

35 <220>
 <223> sonda PREPc.

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (10)..(10)
 <223> "n" es CNVK

40 <400> 4
 caccagcan ttggc 16

<210> 5
 <211> 16
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

45 <220>
 <223> sonda PREPd.

<220>
 <221> misc_feature

50

	<222> (12)..(12)	
	<223> "n" es CNVK	
	<400> 5	
	cgcacccagc antttg	16
5	<210> 6	
	<211> 21	
	<212> ADN	
	<213> <i>Homo sapiens</i>	
	<400> 6	
10	gaacgtactg gtgaaaacac c	21
	<210> 7	
	<211> 21	
	<212> ADN	
	<213> <i>Homo sapiens</i>	
	<400> 7	
15	gcatggatt ctttctctc c	21
	<210> 8	
	<211> 16	
	<212> ADN	
20	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> sonda PREP-A	
	<220>	
	<221> misc_feature	
25	<222> (3)..(3)	
	<223> "n" es CNVK	
	<400> 8	
	aanaaaaaaa aaaaaa	16
	<210> 9	
30	<211> 16	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> sonda PREP-G	
35	<220>	
	<221> misc_feature	
	<222> (3)..(3)	
	<223> "n" es CNVK	
	<400> 9	
40	ggnggggggg gggggg	16
	<210> 10	
	<211> 16	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
45	<220>	
	<223> sonda PREP-AG	
	<220>	
	<221> misc_feature	
50	<222> (3)..(3)	
	<223> "n" es CNVK	
	<400> 10	
	agnagagaga gagaga	16

<210> 11
 <211> 18
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 5 <220>
 <223> sonda L861 AS

 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (15)..(15)
 10 <223> "n" es CNVK

 <400> 11
 ctctccgca cccancag 18

 <210> 12
 <211> 18
 15 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

 <220>
 <223> sonda L861 S

 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (14)..(14)
 20 <223> "n" es CNVK

 <400> 12
 ttgggctggc caanctgc 18

 25 <210> 13
 <211> 16
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

 <220>
 30 <223> sonda T790 AS

 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (4)..(4)
 <223> "n" es CNVK

 35 <400> 13
 tganctgcgt gatgag 16

 <210> 14
 <211> 16
 <212> ADN
 40 <213> Secuencia artificial

 <220>
 <223> sonda T790 S

 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (3)..(3)
 <223> "n" es CNVK

 45 <400> 14
 canctcatca cgcagc 16

 <210> 15
 <211> 15
 <212> ADN
 50 <213> Secuencia artificial

ES 2 805 794 T3

<220>
 <223> sonda L858 AS

5 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (3)..(3)
 <223> "n" es CNVK

<400> 15
 cantttggcc agccc 15

10 <210> 16
 <211> 16
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

15 <220>
 <223> sonda L858 S

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (3)..(3)
 <223> "n" es CNVK

20 <400> 16
 cantttgggc tggcca 16

<210> 17
 <211> 18
 <212> ADN
 <213> *Homo sapiens*

25 <400> 17
 cagaagccta cgtgatgg 18

<210> 18
 <211> 19
 <212> ADN
 <213> *Homo sapiens*

30 <400> 18
 acctttgcga tctgcacac 19

<210> 19
 <211> 190
 <212> ADN
 <213> *Homo sapiens*

35 <400> 19

cagaagccta cgtgatggcc agcgtggaca acccccacgt gtgccgcctg ctgggcatct 60

gcctcacctc caccgtgcag ctcatcacgc agctcatgcc cttcgggtgc ctctggact 120

atgtccggga acacaaagac aatattggct cccagtacct gctcaactgg tgtgtgcaga 180

tcgcaaaggt 190

40 <210> 20
 <211> 13
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Sonda de ANB total

45 <220>
 <221> misc_feature

ES 2 805 794 T3

<222> (4)..(4)
 <223> ANB

5
 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (8)..(8)
 <223> ANB

10
 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (11)..(11)
 <223> ANB

<400> 20
 cttcggctgc ctc 13

15
 <210> 21
 <211> 190
 <212> ADN
 <213> *Homo sapiens*

<400> 21

 cagaagccta cgtgatggcc agcgtggaca acccccacgt gtgccgcctg ctgggcatct 60
 gcctcacctc caccgtgcaa ctcatcatgc agctcatgcc cttcggctgc ctctggact 120
 atgtccggga acacaaagac aatattggct cccagtacct gctcaactgg tgtgtgcaga 180
 tcgcaaaggt 190

20
 <210> 22
 <211> 16
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> sonda PREPe.

25
 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (4)..(4)
 <223> "n" es CNVK

30
 <400> 22
 gcanccagca gtttgg 16

<210> 23
 <211> 16
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

35
 <220>
 <223> sonda PREPf.

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (4)..(4)
 <223> "n" es CNVK

40
 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (14)..(14)
 <223> i

45
 <400> 23
 gcanccagca gttngg 16

<210> 24
 <211> 16
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

5

<220>
 <223> sonda PREPg.

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (4)..(4)
 <223> "n" es CNVK

10

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (13)..(14)
 <223> i

15

<400> 24
 gcanccagca gtnngg 16

<210> 25
 <211> 16
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

20

<220>
 <223> sonda PREPh.

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (4)..(4)
 <223> "n" es CNVK

25

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (12)..(14)
 <223> i

30

<400> 25
 gcanccagca gnnngg 16

<210> 26
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

35

<220>
 <223> Sonda de ANB total

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (9)..(9)
 <223> ANB

40

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (14)..(14)
 <223> ANB

45

<400> 26
 cagcatgtca agatcacaga 20

50

<210> 27
 <211> 16
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

<220>

	<223> sonda L861 S	
	<220>	
	<221> misc_feature	
5	<222> (4)..(4)	
	<223> "n" es CNVK	
	<400> 27	
	ctgnccaaac tgctgg	16
	<210> 28	
10	<211> 16	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> sonda L861 AS	
15	<220>	
	<221> misc_feature	
	<222> (4)..(4)	
	<223> "n" es CNVK	
	<220>	
20	<221> misc_feature	
	<222> (13)..(13)	
	<223> i	
	<400> 28	
	gcancagca gtntgg	16
	<210> 29	
25	<211> 16	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> sonda L861 S	
30	<220>	
	<221> misc_feature	
	<222> (5)..(5)	
	<223> "n" es CNVK	
35	<220>	
	<221> misc_feature	
	<222> (14)..(14)	
	<223> i	
	<400> 29	
40	ccaanctgct gggngc	16
	<210> 30	
	<211> 20	
	<212> ADN	
	<213> <i>Homo sapiens</i>	
45	<400> 30	
	gcatgaacta ctggaggac	20
	<210> 31	
	<211> 20	
	<212> ADN	
	<213> <i>Homo sapiens</i>	
50	<400> 31	
	acctaaagcc acctccttac	20
	<210> 32	

ES 2 805 794 T3

<211> 174
<212> ADN
<213> *Homo sapiens*

<400> 32

gcatgaacta cttggaggac cgtcgcttgg tgcaccgcca cctggcagcc aggaacgtac 60

tggtgaaaac accgcagcat gtcaagatca cagatcttgg gctggccaaa ctgctgggtg 120

cggaagagaa agaataccat gcagaaggag gcaaagtaag gaggtggctt tggt 174

5

REIVINDICACIONES

1. Un procedimiento de fotoacoplamiento, **caracterizado por** hibridar con un sitio diana presente en una muestra de ácido nucleico con una primera sonda que tiene una secuencia complementaria al sitio diana y que contiene un nucleótido fotosensible, en una solución de reacción, y llevar a cabo el fotoacoplamiento por fotoirradiación, en el que el autoensamblaje causado por el nucleótido fotosensible contenido en la primera sonda se suprime coexistiendo con una segunda sonda que es altamente complementaria a la primera sonda, y en el que la primera sonda y la segunda sonda están diseñadas de manera que el nucleótido fotosensible en la primera sonda no está fotoacoplado con la segunda sonda, en el que ser altamente complementaria significa un estado en el que la primera sonda y la segunda sonda son complementarias entre sí, y una base en la primera sonda que se fotoacopla con el nucleótido fotosensible en condiciones predeterminadas de fotoacoplamiento hibrida con la segunda sonda.
2. El procedimiento de fotoacoplamiento de acuerdo con la reivindicación 1, en el que un nucleótido diana contenido en el sitio diana presente en la muestra de ácido nucleico se fotoacopla con el nucleótido fotosensible contenido en la primera sonda.
3. El procedimiento de fotoacoplamiento de acuerdo con las reivindicaciones 1 o 2, en el que dicha primera sonda y dicha segunda sonda contienen nucleótidos fotosensibles, y una tercera sonda que tiene una secuencia complementaria a la primera sonda o la segunda sonda se usa de modo que el nucleótido fotosensible o los nucleótidos fotosensibles presentes en la primera sonda y/o la segunda sonda no se pueden acoplar por sí misma en una región no complementaria entre la primera sonda y la segunda sonda.
4. El procedimiento de fotoacoplamiento de acuerdo con la reivindicación 1, **caracterizado por** una cuarta sonda que tiene una secuencia complementaria al sitio diana y que contiene un nucleótido diana que es un sitio que contiene una secuencia de nucleótidos a la que se une un nucleótido fotosensible, y con el cual se asocian, de modo que se coloquen adyacentes en una solución de reacción, y lleven a cabo el fotoacoplamiento mediante fotoirradiación entre el nucleótido diana contenido en la cuarta sonda y el nucleótido fotosensible contenido en la primera sonda, en el que la primera sonda está diseñada de tal manera que el nucleótido fotosensible se coloca en el extremo terminal de la primera sonda y en el que la cuarta sonda está diseñada de modo que el nucleótido diana capaz del fotoacoplamiento se coloca en su extremo adyacente a la primera sonda.
5. El procedimiento de fotoacoplamiento de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, **caracterizado por** usar la primera sonda en la que un nucleótido que se autoensambla con el nucleótido fotosensible en la primera sonda se sustituye por un nucleótido que no es capaz de fotoacoplarse con el nucleótido fotosensible, y **caracterizado porque** ese fotoacoplamiento de la propia primera sonda se suprime.
6. El procedimiento de fotoacoplamiento de acuerdo con la reivindicación 5, en el que el nucleótido que no es capaz de fotoacoplarse con el nucleótido fotosensible es una base de purina o una base sintética obtenida mediante la conversión artificial de un anillo de pirimidina.
7. El procedimiento de fotoacoplamiento de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, en el que una sustancia aniónica está contenida en la solución de reacción o al menos una sonda de fotoacoplamiento está contenida a una concentración de 0,1 $\mu\text{mol/l}$ o más en la solución de reacción.
8. Un procedimiento de análisis de genes, que usa el procedimiento de fotoacoplamiento de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7.
9. El procedimiento de análisis de genes de acuerdo con la reivindicación 8, que es un procedimiento para la detección de genes o un procedimiento para la amplificación de ácido nucleico.
10. Un procedimiento de detección de ácido nucleico mutado, **caracterizado porque** el procedimiento para la amplificación de ácido nucleico de la reivindicación 9 es un procedimiento para detectar la presencia o ausencia del ácido nucleico mutado, amplificando selectivamente una secuencia de nucleótidos para la amplificación que contiene un sitio diana del ácido nucleico mutado.
11. Un kit de fotoacoplamiento, **caracterizado porque** comprende una primera sonda que tiene una secuencia complementaria a un sitio diana presente en una muestra de ácido nucleico, y que contiene un nucleótido fotosensible, y una segunda sonda que es altamente complementaria a la primera sonda, en el que la primera sonda y la segunda sonda están diseñadas de modo que el nucleótido fotosensible en la primera sonda no está fotoacoplado con la segunda sonda, y en la que ser altamente complementario significa un estado en el que la primera sonda que contiene un nucleótido fotosensible y la segunda sonda son complementarias entre sí, y una base que se va a fotoacoplar con el nucleótido fotosensible en la secuencia propia de la primera sonda en condiciones predeterminadas de fotoacoplamiento hibrida con la segunda sonda complementaria.
12. El kit de fotoacoplamiento según la reivindicación 11, en el que la primera sonda es capaz de fotoacoplarse con un nucleótido diana contenido en el sitio diana presente en la muestra de ácido nucleico.
13. El kit de fotoacoplamiento según la reivindicación 11, que comprende además una cuarta sonda que contiene un

nucleótido diana capaz de fotoacoplarse con el nucleótido fotosensible contenido en la primera sonda, en el que la primera sonda está diseñada de tal manera que el nucleótido fotosensible se coloca en el extremo terminal de la primera sonda y en el que la cuarta sonda está diseñada de modo que el nucleótido diana capaz de fotoacoplamiento se coloca en su extremo terminal adyacente a la primera sonda.

- 5 14. El kit de fotoacoplamiento de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 11 a 13, en el que dicha segunda sonda contiene un nucleótido fotosensible.

15. El kit de fotoacoplamiento de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 11 a 14, en el que la primera sonda es una sonda en la cual un nucleótido que se autoensambla con el nucleótido fotosensible en la primera sonda se sustituye con un nucleótido que no es capaz de fotoacoplarse con el nucleótido fotosensible.

Figura 1

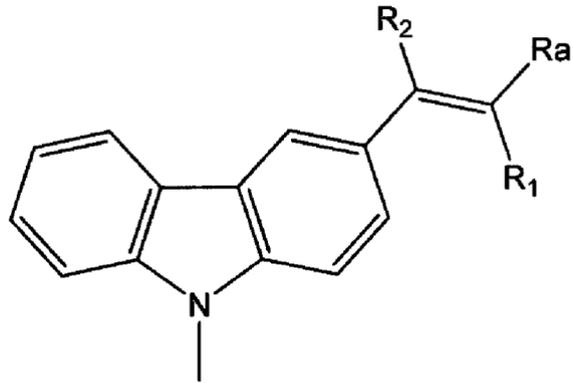


Figura 2

PREPa.

5'- CAGCAXTTTGGCCAGC -3'

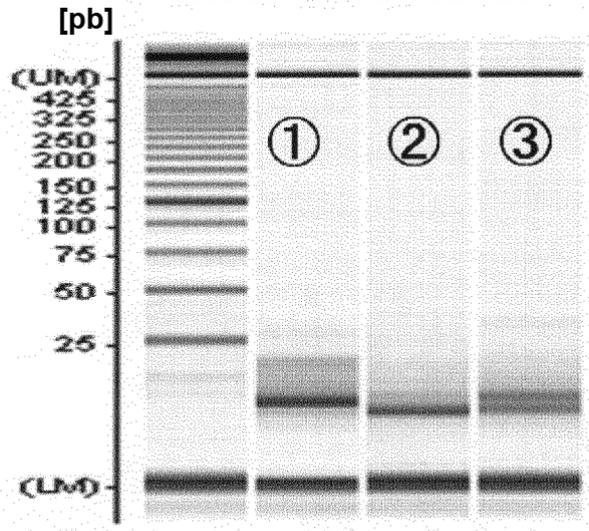


Figura 3

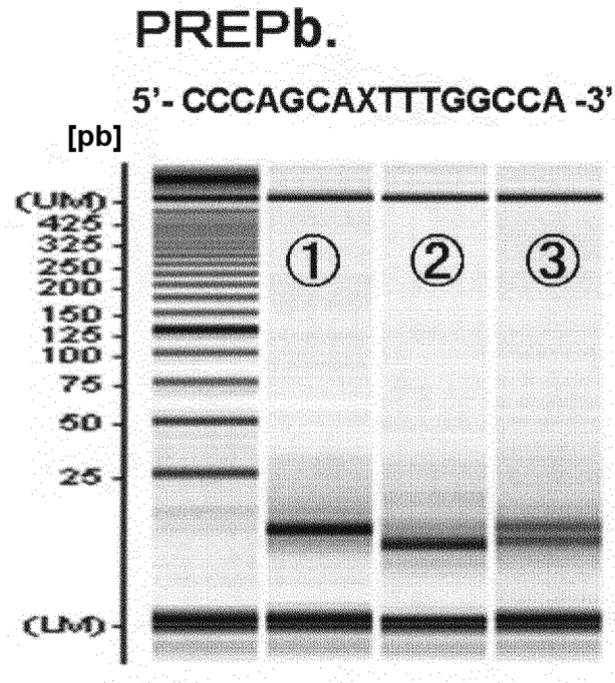


Figura 4

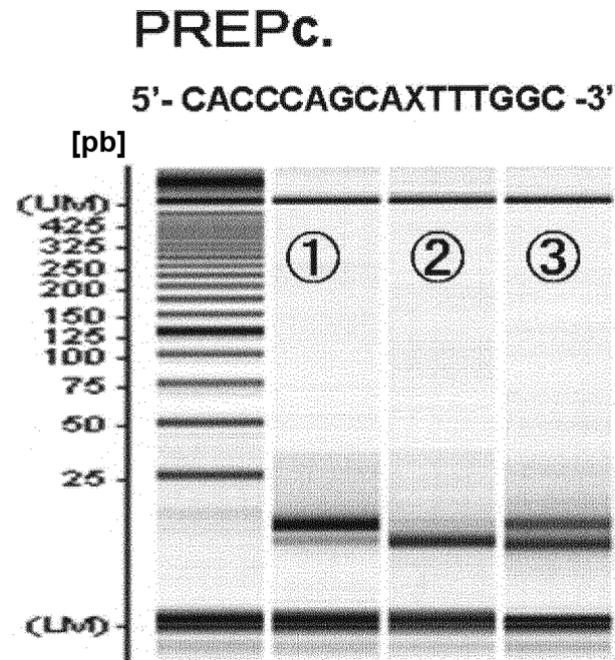


Figura 5

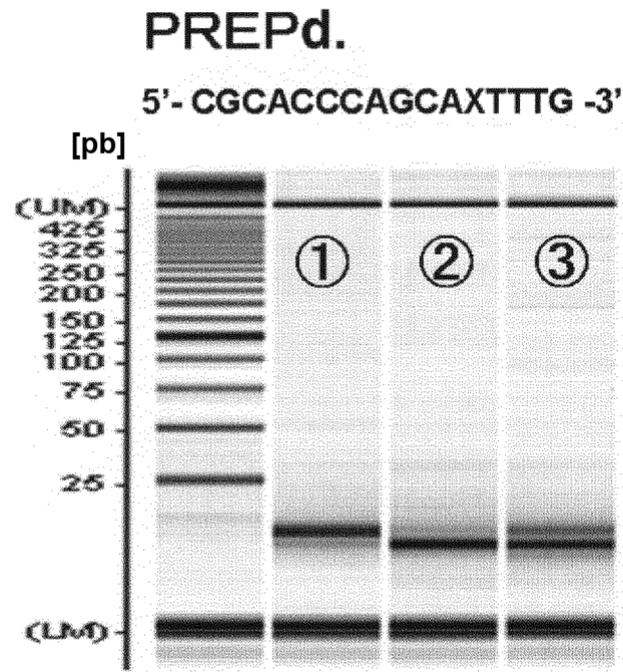


Figura 6

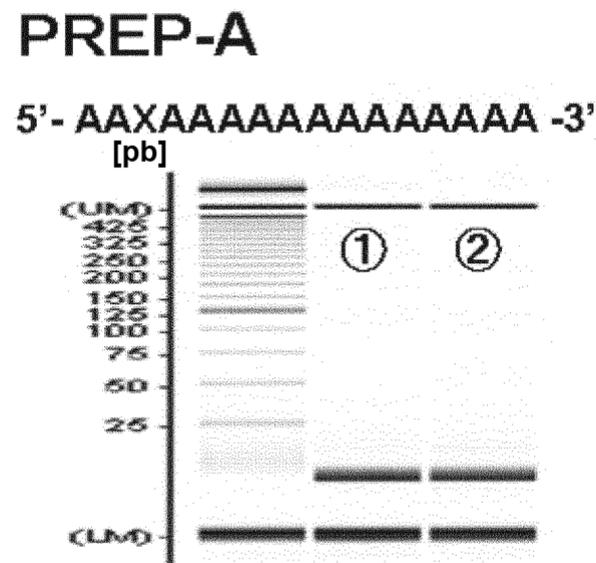


Figura 7

PREP-G

5'- GGXGGGGGGGGGGGGGGG -3'
[pb]

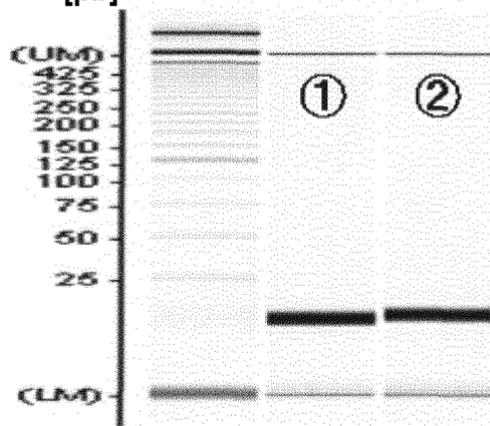


Figura 8

PREP-AG

5'- AGXAGAGAGAGAGAGA -3'
[pb]

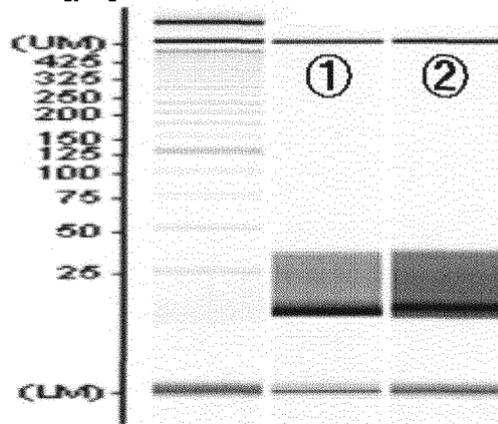


Figura 9

(1) L861

PREP	Secuencia
Cadena L861 AS	3' - <u>GAC</u> XACCCACGCCTTCTC-5'
Cadena L861 S	5' -TTGGGCTGGCCAAX <u>CTGC</u> -3'

(2) T790

PREP	Secuencia
Cadena T790 AS	3' -GAGTAGT <u>GCG</u> TCXAGT-5'
Cadena T790 S	5' -CAXCTCATCACGCAGC-3'

(3) L858

PREP	Secuencia
Cadena L858 AS	3' -CCCG <u>GAC</u> CGGTTTXAC-5'
Cadena L858 S	5' -GAXTTTGGGCTGGCCA-3'

Subrayado: sitio diana

Figura 10

(1) L861

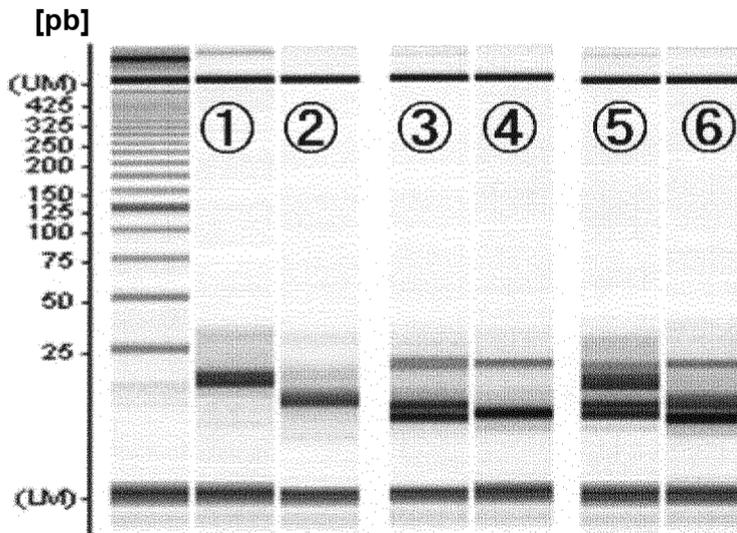


Figura 11

(2) T790

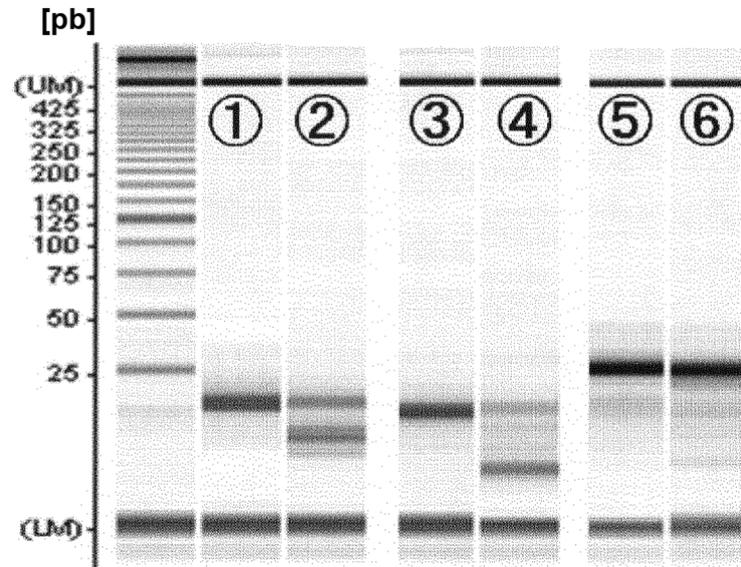


Figura 12

(3) L858

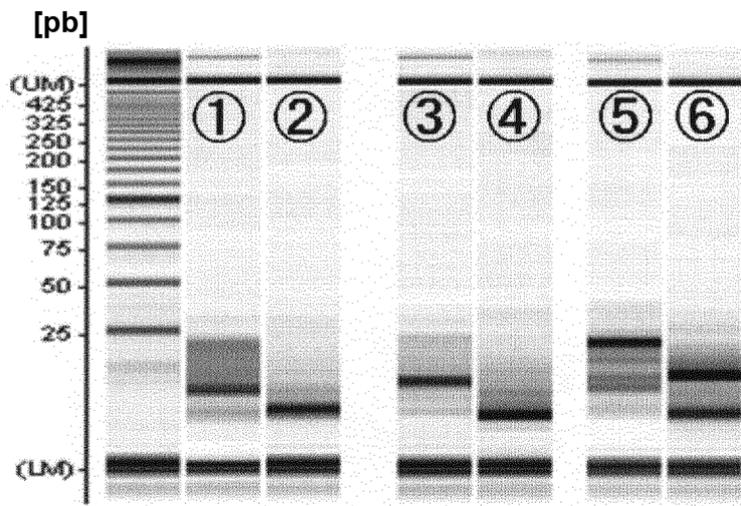


Figura 13

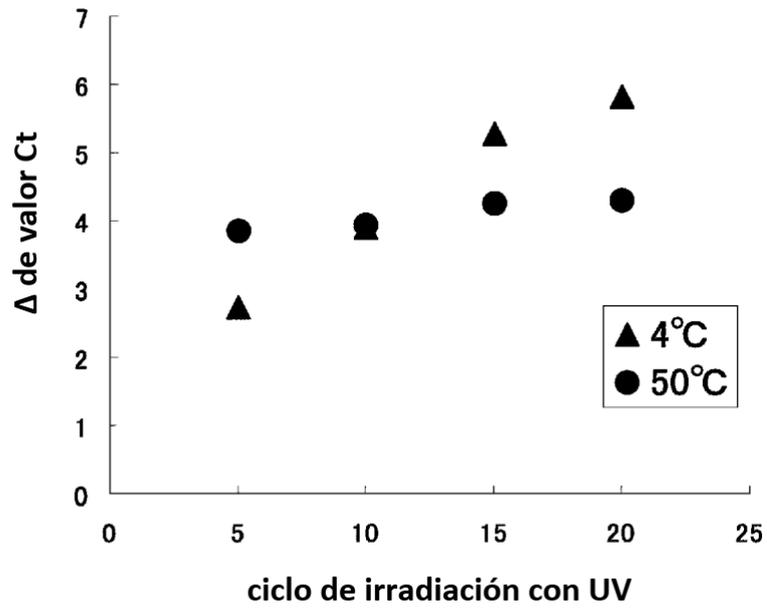


Figura 14

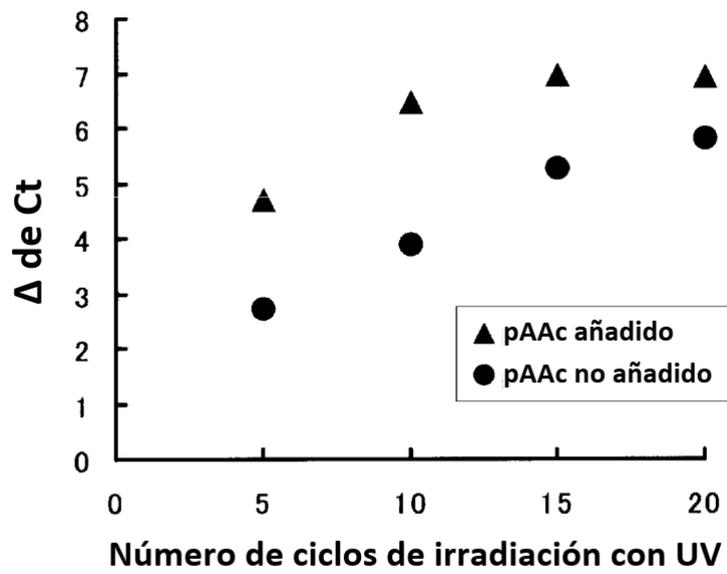


Figura 15

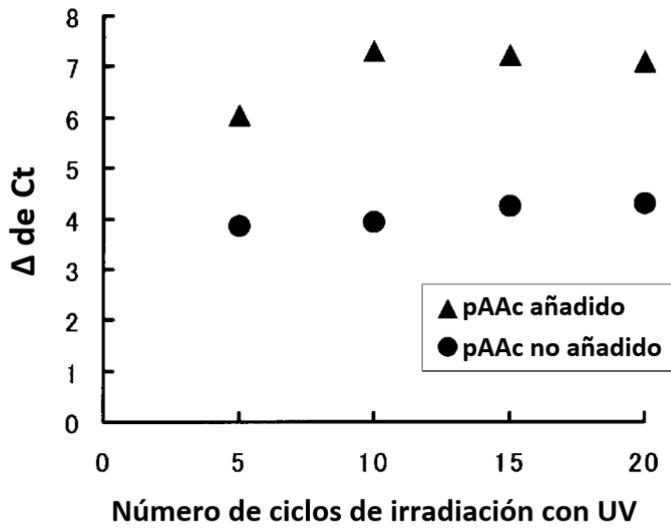


Figura 16

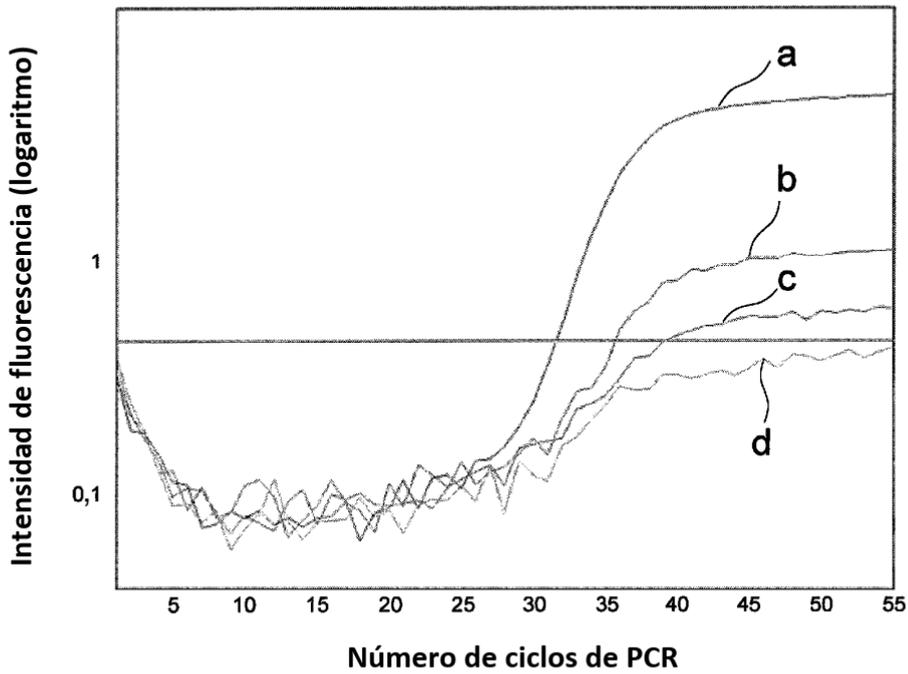


Figura 17

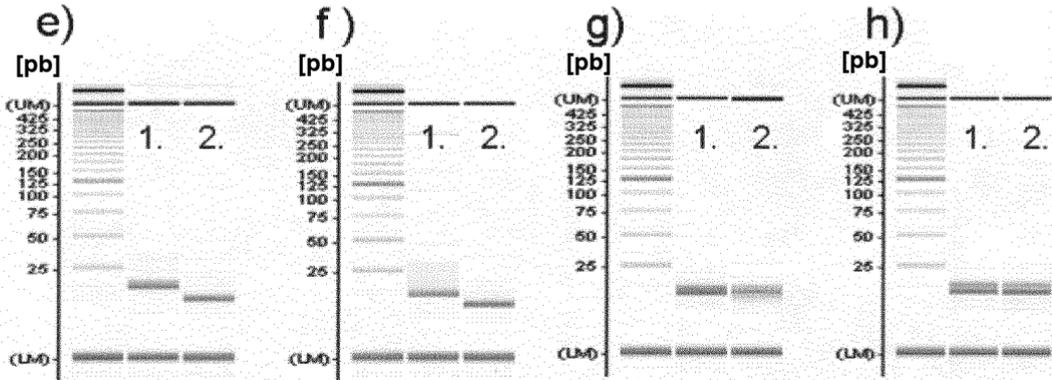


Figura 18

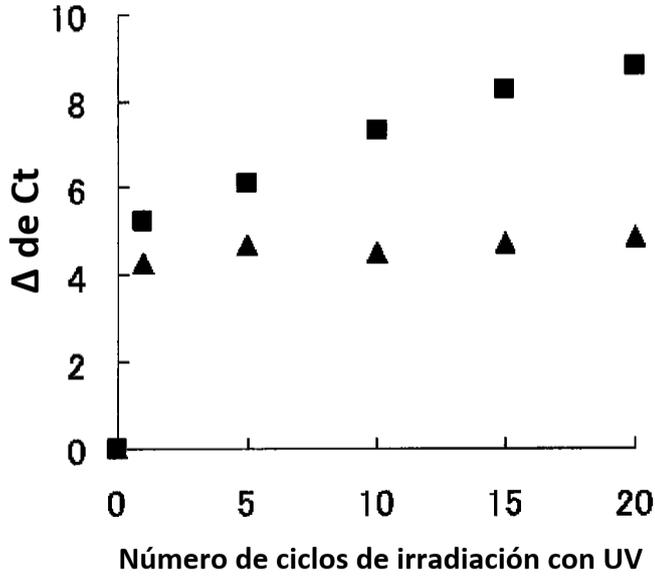


Figura 19

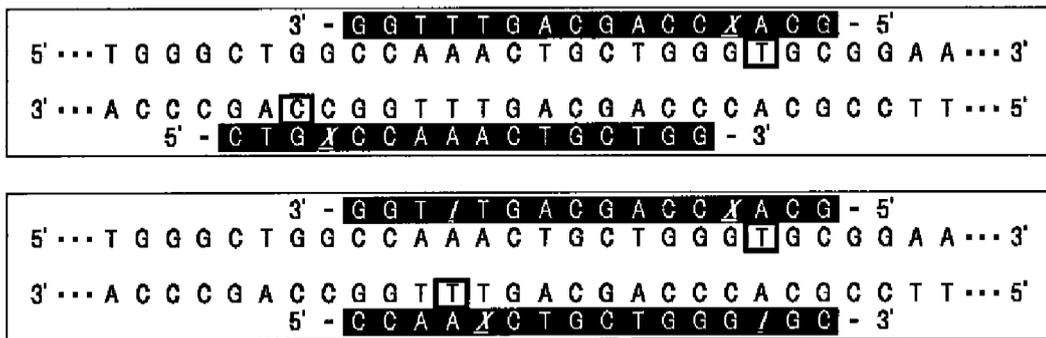


Figura 20

