

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 662 825**

51 Int. Cl.:

**C12Q 1/68** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **24.02.2014** E 14156323 (9)

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **13.12.2017** EP 2770065

54 Título: **Detección de variación de nucleótido en una secuencia de ácidos nucleicos diana**

30 Prioridad:

**25.02.2013 WO PCT/KR2013/001492**  
**28.05.2013 US 201361827966 P**

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:  
**09.04.2018**

73 Titular/es:

**SEEGENE, INC. (100.0%)**  
**8FI, 9FI Taewon Bldg. 65-5, Bangi-dong Songpa-**  
**gu**  
**Seoul 138-050, KR**

72 Inventor/es:

**CHUN, JONG YOON y**  
**LEE, YOUNG JO**

74 Agente/Representante:

**ISERN JARA, Jorge**

**ES 2 662 825 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

Detección de variación de nucleótido en una secuencia de ácidos nucleicos diana

5 Antecedentes de la invención

Campo de la invención

10 La presente invención se refiere a la detección de una variación de nucleótido en una secuencia de ácidos nucleicos diana usando un bloqueador de amplificación y un ensayo de VD-PTOCE (Detección de Variación por Escisión y Extensión de PTO).

Descripción de la técnica relacionada

15 La hibridación de ADN es un proceso fundamental en biología molecular y se ve influido por la fuerza iónica, composición, longitud o fragmento de bases a la que se ha reducido el ácido nucleico, el grado con falta de coincidencias, y la presencia de agentes desnaturalizantes. Las tecnologías basadas en hibridación de ADN podrían ser una herramienta muy útil en la determinación de secuencia de ácidos nucleicos específica y claramente podrían ser valiosas en análisis de diagnóstico clínico, investigación genética, y laboratorio forense.

20 Sin embargo, es muy probable que los métodos y procesos convencionales que dependen en gran medida en la hibridación produzcan resultados de falso positivo debido a la hibridación no específica entre sondas y secuencias no diana. Por lo tanto, para mejorar su viabilidad quedan problemas por resolver.

25 Además de los procesos de hibridación de sonda, se han sugerido varios enfoques que usan reacciones enzimáticas adicionales, por ejemplo, el método con la sonda TaqMan™.

30 En el método con la sonda TaqMan™, la sonda etiquetada y brigada con una secuencia de ácidos nucleicos diana se escinde mediante una actividad de 5' nucleasa de una ADN polimerasa dependiente de cebador cadena arriba, que genera una señal que indica la presencia de una secuencia diana (documentos de Patente de Estados Unidos N.ºs 5.210.015, 5.538.848 y 6.326.145). El método con la sonda TaqMan™ sugiere dos enfoques para generación de señales: escisión dependiente de polimerización y escisión independiente de polimerización. En la escisión dependiente de polimerización, la extensión del cebador cadena arriba se debe producir antes de que un ácido nucleico polimerasa encuentre el extremo en la posición 5' terminal de la sonda etiquetada. A medida que la reacción de extensión continua, la polimerasa escinde de forma progresiva el extremo en la posición 5' terminal de la sonda etiquetada. En la escisión independiente de polimerización, el cebador cadena arriba y la sonda etiquetada se hibridan con una secuencia de ácidos nucleicos diana a corta distancia de modo que la unión de la ácido nucleico polimerasa al extremo en la posición 3' terminal del cebador cadena arriba la pone en contacto con el extremo en la posición 5' terminal de la sonda etiquetada para liberar la etiqueta. Además, el método con la sonda TaqMan™ desvela que la sonda etiquetada en su extremo en la posición 5' terminal que tiene una región en la cola en la posición 5' no hibridable con una secuencia diana también se escinde para formar un fragmento que comprende la región en la cola en la posición 5'.

45 Se ha informado de algunos métodos en los que una sonda que tiene una región en la cola en la posición 5' no complementaria a una secuencia diana se extiende por 5' nucleasa para liberar un fragmento que comprende la región en la cola en la posición 5'.

50 Por ejemplo, el documento de Patente de Estados Unidos N.º 5.691.142 desvela una estructura de escisión a digerir por actividad de 5' nucleasa de ADN polimerasa. La estructura de escisión se ejemplifica en que un oligonucleótido que comprende una porción en la posición 5' no complementaria y una porción en la posición 3' complementaria a un molde se hibrida con el molde y un oligonucleótido cadena arriba se hibrida con el molde a corta distancia. La estructura de escisión se escinde por ADN polimerasa que tiene actividad de 5' nucleasa o ADN polimerasa modificada con actividad sintética reducida para liberar la porción en la posición 5' no complementaria al un molde. La porción en la posición 5' liberadas se hibrida a continuación con un oligonucleótido que tiene una estructura de horquilla para formar una estructura de escisión, induciendo de ese modo reacciones de escisión progresivas para detectar una secuencia diana.

60 El documento de Patente de Estados Unidos N.º 7.381.532 desvela un proceso en el que la estructura de escisión que tiene el oligonucleótido cadena arriba con el extremo en la posición 3' terminal bloqueado se escinde por ADN polimerasa que tiene actividad de 5' nucleasa o FEN nucleasa para liberar la región «solapa» (flap) en la posición 5' no complementaria y la región «solapa» (flap) en la posición 5' liberada se detecta por análisis de tamaño o etiqueta doble interactiva. El documento de Patente de Estados Unidos N.º 6.893.819 desvela que las regiones «solapa» (flaps) liberadas detectables se producen mediante un método de amplificación secuencial mediada la región «solapa» (flap), dependiente de síntesis de ácido nucleico. En este método, una la región «solapa» (flap) liberada de una primera estructura de escisión escinde, de una manera dependiente de síntesis de ácido nucleico, una segunda estructura de escisión para liberar una la región «solapa» (flap) de la segunda estructura de escisión y las regiones

«solapa» (flaps) liberadas se detectan. El documento de Patente de Estados Unidos N.º 7.309.573 desvela un método que incluye la formación de una la región «solapa» (flap) liberada producida por una síntesis de ácido nucleico; extensión de la región «solapa» (flap) liberada; escisión de un oligonucleótido durante la extensión de la región «solapa» (flap) y detección de una señal generada por la escisión del oligonucleótido.

Con la hibridación de sondas etiquetadas con fluorescencia en una fase líquida, una pluralidad de secuencias de ácidos nucleicos diana se pueden detectar de forma simultánea usando incluso un solo tipo de una etiqueta fluorescente mediante análisis de curva de fusión. Sin embargo, las tecnologías convencionales para detección de secuencias diana mediante escisión mediada por 5' nucleasa de sondas doblemente etiquetadas interactivas requieren tipos de etiquetas fluorescentes para diferentes secuencias diana en detección de diana multiplexada, que limita el número de secuencias diana a detectar debido a la limitación del número de tipos de etiquetas fluorescentes.

La Pub. de Sol. de Pat. de Estados Unidos N.º 2008-0241838 desvela un método de detección de diana usando la escisión de una sonda que tiene una porción en la posición 5' no complementaria a una secuencia de ácidos nucleicos diana hibridación de una sonda de captura. Una etiqueta se coloca en la porción en la posición 5' no complementaria. La sonda etiquetada hibridada con la secuencia diana se escinde para liberar un fragmento, tras lo cual el fragmento se hibrida a continuación con la sonda de captura para detectar la presencia de la secuencia diana. En este método, es necesario que una sonda sin escindir/intacta no se hibride con la sonda de captura. Para eso, la sonda de captura que tiene una longitud más corta se tiene que inmovilizar sobre un sustrato sólido. Sin embargo, una limitación de este tipo da como resultado una eficacia menor de la hibridación sobre un sustrato sólido y también dificultades de optimización de las condiciones de reacción.

Por lo tanto, en la técnica aún quedan necesidades observadas desde hace tiempo de desarrollar nuevos enfoques para detección de la secuencia diana, preferentemente múltiples secuencias diana, en una fase líquida y sobre una fase sólida pero no solamente mediante hibridación sino también reacciones enzimáticas tales como reacción nucleolítica en la posición 5' de una manera más conveniente, fiable y reproducible. Además, en la técnica también se necesita un nuevo método de detección de diana no limitado por el número de tipos de etiquetas (en particular, etiquetas fluorescentes).

Mientras tanto, las variaciones de nucleótidos son importantes en investigación y en los campos clínicos. Entre ellas, los polimorfismos de un solo nucleótido (SNP) se encuentran más habitualmente en un genoma humano y sirven como marcadores para locus y farmacogenética relacionados con enfermedades (Landegren et ál., 1998; Roses, 2000). Los SNP se encuentran a la tasa de aproximadamente 1 por 1000 pb en un genoma humano y se calcula que su número total es de aproximadamente tres millones. Para la detección de variaciones de nucleótido tales como SNP, delección, inserción y translocación, se ha informado de diversas tecnologías de diferenciación alélica.

La sonda TaqMan específica de alelo se diseña de modo que se hibrida solamente consecuencias diana perfectamente emparejadas en la etapa de extensión de PCR. La sonda TaqMan tiene una molécula indicadora y una molécula de interrupción capaz de interrumpir la señal fluorescente de la molécula indicadora. La sonda TaqMan hibridada con secuencias diana se difiere por actividad de 5' nucleasa de la Taq ADN polimerasa y la molécula indicadora y la molécula de interrupción se separan para generar una señal diana. Para diferenciación alélica, se usaron sondas de 13-20 meros conjugadas con agente de enlace de surco menor (MGB) (Livak, et ál., Genet. Anal. 14: 143-149 (1999)). Dado que el método de diferenciación alélica que usa la sonda TaqMan emplea no solamente reacción de hibridación sino también reacciones enzimáticas de actividad de 5' nucleasa, su especificidad aumenta. Sin embargo, el método presenta serios problemas tales como dificultades en el diseño de la sonda específica de alelo y condiciones de reacción optimizadas que tienen que diferenciar las diferencias con una falta de coincidencias. Además, el conjugado con MGB es uno de los elementos de resolución de problemas en la sonda TaqMan específica de alelo.

Se desvelan métodos de fijación de PCR para detección de una población mutante minoritaria mediante amplificación preferente de alelo mutante con fijación de PNA o LNA. El método de fijación de PCR representativo que usa PNA se desvela en Henrik et ál., Nucleic Acid Research 21: 5332-5336 (1993) y Luo et ál., Nucleic Acid Research Vol. 34, No 2 e12 (2006). Sin embargo, los métodos de fijación de PCR probablemente no van a bloquear perfectamente la amplificación del alelo de tipo silvestre. Lyamichev V. et ál., Nature Biotechnology vol. 17, marzo de 1999, p.292-296 desvela la detección de variaciones de un solo nucleótido con balizas moleculares etiquetadas. No se mencionan bloqueadores de amplificación. Además, Olivier M., Mutation Research 573 (2005), p. 103-110, desvela detección de polimorfismo de un solo nucleótido usando endonucleasas Flap. Sin embargo, no se mencionan bloqueadores de amplificación. Por último, Marras et ál., Genetic Analysis 14 (1999), p. 151-156 desvela el ensayo invasor para formación de genotipos de SNP usando endonucleasas FLAP específicas de estructura. De forma análoga, no se mencionan bloqueadores de amplificación.

Por lo tanto, en la técnica aún quedan necesidades observadas desde hace tiempo de desarrollar nuevos enfoques para detección de una variación de nucleótido de una manera más conveniente, fiable y reproducible, que pueda estar libre de efectos de las tecnologías convencionales.

A través de la presente solicitud, se hace referencia a diversas patentes y publicaciones y las menciones se proporcionan entre paréntesis.

#### Sumario de la invención

5 Los presentes inventores han realizado amplias investigaciones para desarrollar nuevos enfoques para detectar una variación de nucleótido diana en un ácido nucleico diana de baja abundancia con una mejora de la fisión y conveniencia, entre otros, de una manera multiplexada. Como resultado, los inventores han establecido nuevos protocolos para detección de una variación de nucleótido diana en un ácido nucleico diana de baja abundancia mejorando un ensayo de VD-PTOCE desarrollado por los presentes inventores (véase el documento PCT/KR2013/001492). Los presentes protocolos están bien adaptados para reacciones en fase líquida así como para reacciones en fase sólida, y asegura en la detección de múltiples variaciones de nucleótidos de baja abundancia con un aumento de la precisión y conveniencia.

15 Por lo tanto, un objeto de la presente invención es proporcionar un método para detectar una variación de nucleótido diana en una secuencia de ácidos nucleicos diana usando un bloqueador de amplificación y un ensayo de VD-PTOCE.

20 Otro objeto de la presente invención es proporcionar un kit para detectar una variación de nucleótido diana en una secuencia de ácidos nucleicos diana usando un bloqueador de amplificación y un ensayo de VD-PTOCE.

Otros objetos y ventajas de la presente invención llegarán a ser evidentes a partir de la descripción detallada que sigue a continuación tomada en conjunto con las reivindicaciones y figuras adjuntas.

#### 25 Breve descripción de las figuras

La Fig. 1 muestra las estructuras esquemáticas de PTO (Oligonucleótido de Sondeo y Etiquetado) y CTO (Oligonucleótido de Captura y Formación de Molde) usados en ensayo de escisión y extensión de PTO (ensayo de PTOCE). Preferentemente, los extremos en la posición 3' terminal del PTO y CTO se bloquean para prohibir su extensión. El PTO-NV es una modificación del PTO, que comprende adicionalmente un sitio de diferenciación de variación de nucleótido que comprende una secuencia complementaria a la variación de nucleótido diana en el ácido nucleico diana, colocada en una parte en el extremo en la posición 5' terminal de la porción de dirección en la posición 3'.

30 La Fig. 2 representa de forma esquemática la amplificación selectiva de una secuencia de ácidos nucleicos diana que contiene una variación de nucleótido diana (es decir, variación diana que contiene materia) usando un bloqueador de amplificación.

La Fig. 3 representa de forma esquemática la detección selectiva de una variación de nucleótido diana con el AB-VD PTOCE de la presente invención.

35 La Fig. 4 representa de forma esquemática un proceso de cotrabajo de un bloqueador de amplificación y PTO-NV para detección de una variación de nucleótido diana en una secuencia de ácidos nucleicos diana. El bloqueador de amplificación y PTO-NV se diseñan para que se sitúan en la misma hebra de una secuencia de ácidos nucleicos diana.

La Fig. 5 representa de forma esquemática la detección selectiva de una variación de nucleótido diana con el AB-VD PTOCE de la presente invención usando el CTO etiquetado con una etiqueta doble interactiva.

40 La Fig. 6 representa de forma esquemática la detección selectiva de una variación de nucleótido diana con el AB-VD PTOCE de la presente invención usando el SO (oligonucleótido de señalización).

La Fig. 7 representa de forma esquemática la detección selectiva de una variación de nucleótido diana con el AB-VD PTOCE de la presente invención usando el HO (oligonucleótido de hibridación).

45 Las Figs. 8A y 8B representan los resultados de la mejora del límite de detección minoritaria con el AB-VD PTOCE de la presente invención.

Las Figs. 9A y 9B representan los resultados de la mejora del límite de detección minoritaria con el AB-VD PTOCE de la presente invención usando SO.

Las Figs. 10A y 10B representan los resultados de la mejora del límite de detección minoritaria con el AB-VD PTOCE de la presente invención usando HO.

#### 55 Descripción detallada de la presente invención

En un aspecto de la presente invención, se proporciona un método para detectar una variación de nucleótido diana en una secuencia de ácidos nucleicos diana usando un bloqueador de amplificación y un ensayo de VD-PTOCE, que comprende:

60 (a) hibridar la secuencia de ácidos nucleicos diana con un par de cebadores que comprende un cebador cadena arriba y un cebador cadena abajo para amplificación del ácido nucleico diana, bloqueador de amplificación que presenta la resistencia a la escisión por 5' nucleasa y un PTO-NV (Oligonucleótido de Sondeo y Etiquetado para Variación de Nucleótido); en el que cada uno del cebador cadena arriba y el cebador cadena abajo comprende una secuencia de nucleótidos de hibridación complementaria a la secuencia de ácidos nucleicos diana; el

bloqueador de amplificación comprende una secuencia complementaria a una variación de nucleótido no diana diferente de la variación de nucleótido diana en la secuencia de ácidos nucleicos diana y el PTO-NV comprende (i) una porción de dirección en la posición 3' que comprende una secuencia de nucleótidos de hibridación complementaria a la secuencia de ácidos nucleicos diana, (ii) una porción de etiquetado en la posición 5' que comprende una secuencia de nucleótidos no complementaria a la secuencia de ácidos nucleicos diana, y (iii) un sitio de diferenciación de variación de nucleótido, que comprende una secuencia complementaria a la variación de nucleótido diana en el ácido nucleico diana, colocada en una parte en el extremo en la posición 5' terminal de la porción de dirección en la posición 3'; en el que el bloqueador de amplificación se hibrida con la secuencia de ácidos nucleicos diana que tiene la variación de nucleótido no diana y no se hibrida con la secuencia de ácidos nucleicos diana que tiene la variación de nucleótido diana; en el que la porción de dirección en la posición 3' del PTO-NV se hibrida con la secuencia de ácidos nucleicos diana y la porción de etiquetado en la posición 5' del PTO-NV no se hibrida con la secuencia de ácidos nucleicos diana; en el que el cebador cadena arriba se sitúa cadena arriba del PTO-NV; el bloqueador de amplificación se sitúa cadena abajo del cebador cadena arriba o el cebador cadena abajo; y el bloqueador de amplificación y el PTO-NV se sitúan entre el cebador cadena arriba y el cebador cadena abajo;

(b) poner en contacto el producto resultante de la etapa (a) con una enzima que tiene una actividad de 5' nucleasa en condiciones para la escisión del PTO-NV; en el que el cebador cadena arriba induce a través de su hebra extendida la escisión del PTO-NV por la enzima que tiene la actividad de 5' nucleasa; en el que la hibridación del bloqueador de amplificación con la secuencia de ácidos nucleicos diana que tiene la variación de nucleótido no diana inhibe la extensión del cebador situado cadena arriba del bloqueador de amplificación, bloqueando de ese modo la amplificación de la secuencia de ácidos nucleicos diana que tiene la variación de nucleótido no diana;

en el que cuando el PTO-NV se hibrida con la secuencia de ácidos nucleicos diana que tiene la variación de nucleótido diana complementaria al sitio de diferenciación de variación de nucleótido, la parte en el extremo 5' terminal de la porción de dirección en la posición 3' forma una doble hebra con la secuencia de ácidos nucleicos diana para inducir la escisión desde un primer sitio de escisión inicial y se libera un primer fragmento; en el que cuando el PTO-NV se hibrida con la secuencia de ácidos nucleicos diana que tiene la variación de nucleótido no diana no complementaria al sitio de diferenciación de variación de nucleótido, la parte en el extremo 5' terminal de la porción de dirección en la posición 3' no forma una doble hebra con la secuencia de ácidos nucleicos diana para inducir la escisión desde un segundo sitio de escisión inicial situado cadena abajo del primer sitio de escisión inicial y se libera un segundo fragmento; en el que el segundo fragmento comprende una porción adicional en el extremo en la posición 3' terminal que permite que el segundo fragmento sea diferente al primer fragmento;

(c) hibridar el fragmento liberado del PTO-NV con un CTO (Oligonucleótido de Captura y Formación de Molde); en el que el CTO comprende, en una dirección de la posición 3' a la posición 5' (i) una porción de captura que comprende una secuencia de nucleótidos complementaria a la porción de etiquetado en la posición 5' o una parte de la porción de etiquetado en la posición 5' del PTO-NV y (ii) una porción de formación de molde que comprende una secuencia de nucleótidos no complementaria a la porción de etiquetado en la posición 5' y la porción de dirección en la posición 3' del PTO-NV; en el que el primer fragmento o el segundo fragmento liberado del PTO-NV se hibrida con la porción de captura del CTO;

(d) realizar una reacción de extensión usando el producto resultante de la etapa (c) y una ácido nucleico polimerasa dependiente de molde; en el que cuando el primer fragmento se hibrida con la porción de captura del CTO, se extiende para formar una hebra extendida que comprende una secuencia extendida complementaria a la porción de formación de molde del CTO; en el que cuando el segundo fragmento se hibrida con la porción de captura del CTO, no se extiende; y

(e) detectar la presencia de la hebra extendida, de modo que la presencia de la hebra extendida indica presencia de la variación de nucleótido diana.

Los presentes inventores han realizado amplias investigaciones para desarrollar nuevos enfoques para detectar una variación de nucleótido diana en un ácido nucleico diana con baja abundancia. Como resultado, los inventores han establecido nuevos protocolos para la detección de una variación de nucleótido diana en un ácido nucleico diana de baja abundancia mejorando un ensayo de VD-PTOCE desarrollado por los presentes inventores (véase el documento PCT/KR2013/001492). El ensayo de VD-PTOCE es una realización particular de un ensayo de PTOCE desarrollado por los presentes inventores (véase el documento WO 2012/096523) para detectar variaciones de nucleótido. Los presentes protocolos están bien adaptados para reacciones en fase líquida así como reacciones en fase sólida, y aseguran la detección de variaciones de múltiples nucleótidos de baja abundancia con una mejora de la precisión y conveniencia.

La presente invención tiene como objeto la detección eficaz de una variación de nucleótido diana en un ácido nucleico diana de baja abundancia aplicando una amplificación precedente de cierta secuencia usando un bloqueador de amplificación para un ensayo de VD-PTOCE usando un PTO-NV (Oligonucleótido de Sondeo y Etiquetado para Variación de Nucleótido).

La presente invención usa sucesos sucesivos seguidos de un bloqueador de amplificación y una hibridación de PTO-NV; escisión de PTO-NV (Oligonucleótido de Sondeo y Etiquetado para Variación de Nucleótido) y extensión; formación de una hebra extendida dependiente de variación de nucleótido; y detección de la hebra extendida. Por lo

tanto, se denomina ensayo de AB-VD PTOCE (Detección de Variación que Implica Bloqueador de Amplificación por Escisión y Extensión de PTO).

5 Las muestras clínicas contienen frecuentemente una baja cantidad de alelo mutante con un exceso de alelo de tipo silvestre. El exceso de alelo de tipo silvestre puede agotar los reactivos esenciales durante el proceso de amplificación y tiende a enmascarar la señal del alelo mutante. Para superar este problema, se ha sugerido una multitud de métodos para amplificar de forma selectiva el alelo mutante a la vez que se suprime la amplificación del alelo de tipo silvestre.

10 Como representativos, los métodos que usan oligonucleótidos que contienen PNA o LNA como un bloqueador de amplificación se han informado (documento US 2004/0014105, documento US 7.803.543, documento US 8.206.929, H. Orum., *Nucleic Acids Research* 21: 5332-5336 (1993) A. Senescau et ál., *Journal of Clinical Microbiology*, 3304-3308 (2005), Y. Nagai et ál., *Cancer Res* 65: 7276-7282 (2005), Henrik et ál., *Nucleic Acid Research* 21: 5332-5336 (1993) y Luo et ál., *Nucleic Acid Research Vol. 34, No 2 e12* (2006)).

15 En general, los bloqueadores de amplificación se hibridan solamente con moldes que tienen una secuencia perfectamente complementaria a los bloqueadores de amplificación en las mismas condiciones, que se diseñan para que no se hibriden con moldes que tienen incluso solo una falta de coincidencias. El molde hibridado con el bloqueador de amplificación que inhibe la hibridación del cebador o la elongación de la cadena no se amplifica y solamente se amplifica el que no se hibrida con el bloqueador de amplificación. Los análogos de ácido nucleico tales como PNA y LNA son útiles como bloqueadores de amplificación en los sentidos en los que muestran diferencias explicativas de  $T_m$  incluso para una sola diferencia de bases.

20 Cuando las polimerasas usadas tienen actividad de nucleasa, es necesario que el bloqueador de amplificación tenga la resistencia a la actividad de nucleasa.

25 Además, los métodos normalmente necesitan sondas adicionales para generación de señales. El bloqueador de amplificación puede tener etiquetas.

30 Cuando una región de variación de nucleótido en una secuencia de ácidos nucleicos diana tiene dos variantes distintas, el bloqueador de amplificación permite detectar de forma eficaz la variante de interés mediante amplificación de la secuencia de ácidos nucleicos diana que tiene la variante de interés pero inhibiendo la amplificación de la secuencia de ácidos nucleicos diana que tiene la otra variante. En particular, el bloqueador de amplificación es muy útil para detectar alelo mutante de baja abundancia en muestras clínicas que contienen exceso de alelo de tipo silvestre y alelo mutante de baja abundancia.

35 Sin embargo, es digno de tener en cuenta que la amplificación de alelo de tipo silvestre no se puede prevenir completamente con el bloqueador de amplificación. De acuerdo con la presente invención con la combinación de dos tecnologías, es decir, el bloqueador de amplificación y el ensayo de VD-PTOCE usando el PTO-NV, es posible detectar un alelo mutante de baja abundancia que no se puede detectar con métodos convencionales.

40 El ensayo de VD-PTOCE de la presente invención usa el PTO-NV que tiene el sitio de diferenciación de variación de nucleótido situado en la parte en el extremo 5' terminal de la porción de dirección en la posición 3' para selectividad del PTO con respecto a una variación de nucleótido específica (véase la Fig. 1). Cuando el PTO-NV se hibrida con la secuencia de ácidos nucleicos diana (es decir, molde de emparejamiento) que tiene la variación de nucleótidos complementaria al sitio de diferenciación de variación de nucleótido, la parte en el extremo 5' terminal de la porción de dirección en la posición 3' forma una doble hebra con el molde de emparejamiento; sin embargo, cuando el PTO-NV se hibrida con una secuencia de ácidos nucleicos diana (es decir, molde con falta de coincidencias) que tiene una variación de nucleótido no complementaria al sitio de diferenciación de variación de nucleótido, la parte en el extremo 5' terminal de la porción de dirección en la posición 3' no forma una doble hebra con el molde con falta de coincidencias.

45 En la presente solicitud, una secuencia de ácidos nucleicos diana que tiene una variación de nucleótido complementaria al sitio de diferenciación de variación de nucleótido del PTO-NV también se describe como "molde de emparejamiento" para el PTO-NV. Una secuencia de ácidos nucleicos diana que tiene una variación de nucleótido no complementaria al sitio de diferenciación de variación de nucleótido del PTO también se describe como "molde con falta de coincidencias" para el PTO-NV.

50 A menos que se indique de otro modo, las expresiones "molde de emparejamiento" y "molde con falta de coincidencias" usadas en el presente documento se determinan con respecto al PTO-NV.

55 Es digno de tener en cuenta que tales patrones de hibridación distintos en la variación de nucleótidos de interés son responsables de diferencias en sitios de escisión inicial del PTO-NV, produciendo de ese modo dos tipos de fragmentos de PTO-NV para proporcionar una diferenciación de señales dependiendo de la presencia de la variación de nucleótidos de interés.

65

Un primer fragmento se genera por escisión de híbrido entre el PTO-NV y el molde de emparejamiento. Un segundo fragmento se genera por escisión de híbrido entre el PTO-NV y el molde con falta de coincidencias. El segundo fragmento comprende adicionalmente nucleótidos en su porción en el extremo en la posición 3' terminal que el primer fragmento.

5 La producción de cualquiera del primer fragmento o el segundo fragmento se puede detectar de manera distinta mediante una reacción de extensión en el CTO.

10 Generalmente, la hibridación entre una parte del extremo en la posición 3' terminal de cebadores y un molde es muy fundamental para la extensión de cebadores en una condición rigurosa. En la presente invención, cada uno del primer fragmento y el segundo fragmento se hibrida con el mismo sitio del CTO. Como se ha descrito anteriormente, el segundo fragmento comprende la porción en el extremo en la posición 3' terminal adicional en comparación con el primer fragmento. Mediante el ajuste de las condiciones de hibridación y una secuencia del CTO enfrentada a la porción en el extremo en la posición 3' terminal adicional del segundo fragmento, solamente se puede permitir que se extienda el primer fragmento.

15 La producción de la hebra extendida por extensión del primer fragmento se puede detectar mediante una diversidad de métodos.

20 Las Figs. 2 y 3 representan de forma esquemática una realización de la presente invención. En el presente documento las Figs. 2 y 3 se proporcionan solamente para la comprensión del principio de rendimiento que subyace a la presente invención. La Fig. 2 representa amplificación selectiva de la variación de diana que contiene molde sin amplificación de la variación no diana que contiene molde debido al bloqueador de amplificación. La Fig. 3 representa la formación selectiva de la hebra extendida. Realmente, la formación selectiva de la hebra extendida también se puede producir durante la amplificación de la variación diana que contiene molde. Como se hace a modo de ejemplo en el Ejemplo 3, una señal detectable se puede observar después de varios ciclos de amplificación.

25 En la Fig. 2, el cebador cadena arriba y el cebador cadena abajo amplifican la variación diana que contiene molde. Sin embargo, la variación no diana que contiene molde no se amplifica debido al bloqueador de amplificación que comprende una secuencia complementaria para una variación de nucleótido no diana. En la Fig. 3, el sitio de diferenciación de variación de nucleótido del PTO-NV comprende una secuencia complementaria a la variación de nucleótido diana. El PTO-NV se hibrida con la variación diana que contiene molde (molde de emparejamiento), y el PTO-NV se escinde en un primer sitio de escisión inicial para formar un primer fragmento, junto con la extensión del cebador cadena arriba, formando de ese modo la hebra extendida en el CTO. Por otro lado, el PTO-NV hibridado con la variación no diana que contiene molde (molde con falta de coincidencias) se escinde en un segundo sitio de escisión inicial para formar un segundo fragmento, junto con la extensión del cebador cadena arriba, de modo que la hebra extendida en el CTO no se forma.

30 Como se representa en la Fig. 3, el PTO-NV se puede hibridar con las dos secuencias de ácidos nucleicos diana cada una de las cuales tiene una variante distinta. Cuando la cantidad de la variante que contiene una variación no diana es significativamente mayor que la de la variante que contiene la variación diana de interés, es probable que el PTO-NV se escinda de forma inútil y se consuma. El ensayo de AB-VD PTOCE asegura la detección de variaciones de múltiples nucleótidos de baja abundancia con un aumento de la precisión y conveniencia al mejorar el ensayo de VD-PTOCE adoptando un bloqueador de amplificación.

35 El ensayo de AB-VD PTOCE se describirá con más detalle cómo sigue a continuación:

40 Etapa (a): Hibridación de un par de cebadores, un bloqueador de amplificación y un PTO-NV en una secuencia de ácidos nucleicos diana

50 De acuerdo con la presente invención, una secuencia de ácidos nucleicos diana se hibrida en primer lugar con un par de cebadores, un bloqueador de amplificación y un PTO-NV (Oligonucleótido de Sondeo y Etiquetado para Variación de Nucleótido).

55 La expresión "ácido nucleico diana", "secuencia de ácidos nucleicos diana" o "secuencia diana" usada en el presente documento se refiere a una secuencia de ácidos nucleicos de interés para detección, que se empareja o se hibrida con una sonda o cebador en condiciones de hibridación, emparejamiento o amplificación.

60 El término "cebador", como se usa en el presente documento, se refiere a un oligonucleótido, que es capaz de actuar como un punto de inicio de síntesis cuando se coloca en condiciones en las que se induce la síntesis del producto de extensión de cebador que es complementario a una hebra de ácido nucleico (molde), es decir, en presencia de nucleótidos y un agente para polimerización, tal como ADN polimerasa, y a una temperatura y pH adecuados.

El término "sonda" usado en el presente documento se refiere a una molécula de ácido nucleico monocatenaria que comprende una porción o porciones que son sustancialmente complementarias a una secuencia de ácidos nucleicos diana.

5 Preferentemente, la sonda y cebador son moléculas de desoxirribonucleótido monocatenario. Las sondas o cebadores usados en la presente invención pueden estar formados por dNMP de origen natural (es decir, dAMP, dGM, dCMP y dTMP), nucleótido modificado, o nucleótido no natural. Las sondas o cebadores también pueden incluir ribonucleótidos.

10 El cebador debe ser lo suficientemente largo como para cebar la síntesis de productos de extensión en presencia del agente para polimerización. La longitud exacta de los cebadores dependerá de muchos factores, incluyendo temperatura, aplicación y fuente del cebador. El término "hibridación" o "cebado", como se usa en el presente documento, se refiere a la yuxtaposición de un oligodesoxinucleótido o ácido nucleico a un ácido nucleico molde, de modo que la yuxtaposición permite que la polimerasa polimerice nucleótidos en una molécula de ácido nucleico que es complementaria al ácido nucleico molde o una porción del mismo.

15 El término "hibridación" usado en el presente documento se refiere a la formación de un ácido nucleico bicatenario a partir de ácidos nucleicos monocatenarios complementarios. La hibridación se puede producir entre dos hebras de ácido nucleico perfectamente emparejadas o sustancialmente emparejadas con algunas faltas de coincidencias. La complementariedad para hibridación puede depender de las condiciones de hibridación, en particular la temperatura.

20 La hibridación de una secuencia de ácidos nucleicos diana con un par de cebadores, un bloqueador de amplificación y un PTO-NV se puede realizar en condiciones de hibridación adecuadas determinadas de forma rutinaria mediante procedimientos de optimización. Las condiciones tales como temperatura, concentración de componentes, hibridación y tiempos de lavado, componentes del tampón, y su pH y fuerza iónica pueden variar dependiendo de diversos factores, incluyendo la longitud del contenido de GC de oligonucleótido (cebadores y PTO) y la secuencia de nucleótidos diana. Por ejemplo, cuando se usa un oligonucleótido relativamente corto, es preferente que se adopten condiciones de baja rigurosidad. Las condiciones detalladas para hibridación se pueden encontrar en Joseph Sambrook, et ál., Molecular Cloning, A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y.(2001); y M.L.M. Anderson, Nucleic Acid Hybridization, Springer-Verlag New York Inc. N.Y.(1999).

No hay una distinción intencionada entre los términos "emparejamiento" e "hibridación", y estos términos se usarán indistintamente.

35 Cada uno del cebador cadena arriba y el cebador cadena abajo comprende una secuencia de nucleótidos de hibridación complementaria a una secuencia de ácidos nucleicos diana. La porción de dirección en la posición 3' del PTO-NV comprende una secuencia de nucleótidos de hibridación complementaria a una secuencia de ácidos nucleicos diana. El término "complementario" se usa en el presente documento para hacer referencia a que los cebadores o sondas son lo suficientemente complementarios para hibridarse de forma selectiva a una secuencia de ácidos nucleicos diana en las condiciones de hibridación o condiciones rigurosas designadas, incluyendo las expresiones "sustancialmente complementario" y "perfectamente complementario", preferentemente perfectamente complementario.

40 La porción de etiquetado en la posición 5' del PTO-NV tienen una secuencia de nucleótidos no complementaria a la secuencia de ácidos nucleicos diana. La porción de formación de molde del CTO (Oligonucleótido de Captura y Formación de Molde) tiene una secuencia de nucleótidos no complementaria a la porción de etiquetado en la posición 5' y la porción de dirección en la posición 3' del PTO. La expresión "no complementario" se usa en el presente documento para hacer referencia a que cebadores o sondas son lo suficientemente no complementarios para no hibridarse de forma selectiva a una secuencia de ácidos nucleicos diana en las condiciones de hibridación o condiciones rigurosas designadas, incluyendo las expresiones "sustancialmente no complementario" y "perfectamente no complementario", preferentemente perfectamente no complementario.

45 Por ejemplo, la expresión "lo complementario" en conjunto con la porción de etiquetado en la posición 5' del PTO-NV se refiere a que la porción de etiquetado en la posición 5' es lo suficientemente no complementaria para no hibridarse de forma selectiva a una secuencia de ácidos nucleicos diana en las condiciones de hibridación o condiciones rigurosas designadas, incluyendo las expresiones "sustancialmente no complementario" y "perfectamente no complementario", preferentemente perfectamente no complementario.

50 El bloqueador de amplificación comprende una secuencia complementaria a una variación de nucleótido no diana diferente a la variación de nucleótido diana en la secuencia de ácidos nucleicos diana. El bloqueador de amplificación se hibrida con la secuencia de ácidos nucleicos diana que tiene la variación de nucleótido no diana y no se hibrida con la secuencia de ácidos nucleicos diana que tiene la variación de nucleótido diana, de ese modo, el bloqueador de amplificación contribuye a la amplificación selectiva de la secuencia de ácidos nucleicos diana que tiene la variación de nucleótido diana.

65

El bloqueador de amplificación se sitúa cadena abajo del cebador cadena arriba o el cebador cadena abajo; y el bloqueador de amplificación y el PTO-NV se sitúan entre el cebador cadena arriba y el cebador cadena abajo;

5 La expresión "variación de nucleótido diana" usada en el presente documento con referencia a una variación de nucleótido presente en una región que produce variación en una secuencia de ácidos nucleicos diana se refiere a una variación de nucleótido a identificar por la presente invención. En el presente método, un sitio de diferenciación de variación de nucleótido de PTO-NV comprende una secuencia complementaria a la variación de nucleótido diana en el ácido nucleico diana.

10 La expresión "variación de nucleótido diana que contiene molde" o "variación de diana que contiene molde" usada en el presente documento se refiere a una molécula de ácido nucleico diana que comprende una variación de nucleótido a identificar por la presente invención.

15 La expresión "variación de nucleótido no diana" usada en el presente documento con referencia a una variación de nucleótido presente en una región que produce variación en una secuencia de ácidos nucleicos diana se refiere a otras variaciones de nucleótidos distintas a la variación de nucleótido diana.

20 La expresión "variación de nucleótido no diana que contiene molde" o "variación o diana que contiene molde" usada en el presente documento se refiere a una molécula de ácido nucleico diana que comprende una variación de nucleótido distinta a la variación de nucleótido diana.

25 Por ejemplo, en la detección de alelo mutante de baja abundancia en un exceso de alelo de tipo silvestre con el presente método, el alelo de tipo silvestre es el ácido nucleico diana que tiene variación de nucleótido no diana y el alelo mutante es el ácido nucleico diana que tiene variación de ácido nucleico. La expresión "variación de nucleótido" incluye un tipo silvestre y cualquier tipo mutante en una posición en particular en una secuencia de ácidos nucleicos.

30 En el presente método, el bloqueador de amplificación comprende una secuencia complementaria a la variación de nucleótido no diana. La variación de nucleótido no diana presente en la región que produce variación puede ser una o más. En tal caso, el bloqueador de amplificación comprende una secuencia complementaria a la variación de nucleótido no diana cuya amplificación no se pretende inhibir. A la inhibición de una pluralidad de variaciones de nucleótido no diana, se puede usar una pluralidad de bloqueadores de amplificación.

35 Las expresiones "variación de nucleótido diana" y "variación de nucleótido no diana" se usan en el presente documento para indicar de forma clara y concisa que una molécula de ácido nucleico se va a hibridar con el PTO-NV y el bloqueador de amplificación.

40 El bloqueador de amplificación que comprende una secuencia complementaria a una variación de nucleótido no diana cuya amplificación se pretende inhibir se hibrida con una secuencia de ácidos nucleicos diana que tiene la variación de nucleótido no diana e inhibe la extensión de un cebador situado cadena arriba del bloqueador de amplificación, bloqueando de ese modo la amplificación de la secuencia de ácidos nucleicos diana.

45 En las mismas condiciones, el bloqueador de amplificación que comprende una secuencia complementaria a una variación de nucleótido no diana no se hibrida con una secuencia de ácidos nucleicos diana que tiene una variación de nucleótido diana debido a la presencia de una secuencia con falta de coincidencias, sin bloquear de ese modo la amplificación de la secuencia de ácidos nucleicos diana.

50 De acuerdo con una realización, el bloqueador de amplificación que comprende una secuencia complementaria a un ADN de tipo silvestre se hibrida con el ADN de tipo silvestre para inhibir la extensión de cebadores, suprimiendo de ese modo la amplificación del ADN de tipo silvestre. El bloqueador de amplificación que comprende una secuencia complementaria a un ADN de tipo silvestre no se hibrida con un ADN mutante, y el ADN mutante se amplifica.

55 Como la presente invención usa la actividad de 5' nucleasa, se requiere que el bloqueador de amplificación tenga la resistencia a la actividad de 5' nucleasa con el fin de evitar la escisión del bloqueador de amplificación. En cierta realización, se diseña al menos un sitio del bloqueador de amplificación atacado por la actividad de 5' nucleasa para que tenga la resistencia a la actividad de 5' nucleasa.

60 En cierta realización, el bloqueador de amplificación tiene la resistencia a la escisión por 5' nucleasa. En cierta realización, el bloqueador de amplificación es un oligonucleótido que se puede hibridar con una secuencia de ácidos nucleicos.

En una realización, el bloqueador de amplificación comprende un nucleósido/nucleótido natural, un análogo de nucleósido/nucleótido o una combinación de los mismos.

65 En una realización, el bloqueador de amplificación es un oligonucleótido que tiene un compuesto resistente a 5' nucleasa tal como un agente de unión a surco menor.

De acuerdo con una realización, el bloqueador de amplificación comprende nucleósidos/nucleótidos que tienen una estructura principal resistente a la actividad de 5' nucleasa.

5 Los nucleósidos/nucleótidos con una estructura principal resistente a la actividad de 5' nucleasa incluyen cualquiera conocido para alguien con experiencia en la materia. Por ejemplo, incluyen diversos enlaces de fosforotioato, enlaces de fosfonato, enlaces de fosforoamidato y modificaciones de carbohidratos en la posición 2'. De acuerdo con una realización más preferente, los nucleótidos que tienen una estructura principal resistente a la 5' nucleasa incluyen enlace de fosforotioato, enlace de fosfotriéster de alquilo, enlace de fosfotriéster de arilo, enlace de fosfonato de alquilo, enlace de fosfonato de arilo, enlace de hidrogenofosfonato, enlace de fosforoamidato de alquilo, enlace de fosforoamidato de arilo, enlace de fosforoselenato, modificación de 2'-O-aminopropilo, modificación de 2'-O-alquilo, modificación de 2'-O-alilo, modificación de 2'-O-butilo, modificación de oligodesoxinucleótido  $\alpha$ -anomérico y modificación de 1-(4'-tio- $\beta$ -D-ribofuranosilo).

15 De acuerdo con una realización, el bloqueador de amplificación comprende ácido nucleico peptídico (PNA), ácido nucleico bloqueado (LNA), Morfolino, ácido nucleico glicólico (GNA), ácido nucleico treósico (TNA), ácidos nucleicos unidos por puente (BNA), oligómeros de N3'-P5' fosforamidato (NP), oligonucleótidos unidos a agente de unión a surco menor (oligonucleótidos unidos a MGB), oligómeros de fosforotioato (PS), oligómeros de fosfonato de alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>4</sub>, fosforamidatos, oligonucleótidos de  $\beta$ -fosfodiéster, oligonucleótidos de  $\alpha$ -fosfodiéster o combinación de los mismos.

20 En una realización particular, el bloqueador de amplificación tiene la resistencia a la 5' nucleasa y muestra cambios significativos en el valor de T<sub>m</sub> incluso con una sola falta de coincidencias, de lo cual es representativo un bloqueador de amplificación que contiene PNA o LNA.

25 El bloqueador de amplificación puede tener cualquier longitud. Por ejemplo, el bloqueador de amplificación puede tener una longitud de 5-100 nucleótidos, 5-80 nucleótidos, 5-50 nucleótidos, 5-40 nucleótidos, 5-30 nucleótidos, 10-100 nucleótidos, 10-80 nucleótidos, 10-50 nucleótidos, 10-40 nucleótidos, 10-30 nucleótidos, 15-100 nucleótidos, 15-80 nucleótidos, 15-50 nucleótidos, 15-40 nucleótidos, 15-30 nucleótidos, 20-100 nucleótidos, 20-80 nucleótidos, 20-50 nucleótidos, 20-40 nucleótidos o 20-30 nucleótidos.

30 De acuerdo con una realización, el extremo en la posición 3' terminal del bloqueador de amplificación se "bloquea" para prohibir su extensión.

35 El sitio de diferenciación de variación de nucleótido (es decir, una región complementaria a la variación de nucleótido no diana) del bloqueador de amplificación que se oponga a la región de variación de nucleótido en la secuencia de ácidos nucleicos diana se puede situar en cualquier sitio del bloqueador de amplificación, siempre y cuando inhiba la amplificación de la secuencia de ácidos nucleicos diana que tiene la variación de nucleótido no diana pero no inhibe la amplificación de la secuencia de ácidos nucleicos diana que tiene la variación de nucleótido diana.

40 En cierta realización, el sitio de diferenciación de variación de nucleótido del bloqueador de amplificación puede estar situado en su extremo en la porción en la posición 5' terminal, porción media o porción en la posición 3' terminal.

45 El bloqueador de amplificación se sitúa cadena abajo del cebador cadena arriba o el cebador cadena abajo y el bloqueador de amplificación se sitúa entre el cebador cadena arriba y el cebador cadena abajo.

50 La distancia entre el extremo en la posición 5' terminal del bloqueador de amplificación y el extremo en la posición 3' terminal del cebador situado cadena arriba del mismo puede no ser inferior a 300, 200, 100, 50, 30, 20, 10, 5, 2 o 1 nucleótidos.

55 En cierta realización, la presente invención se realiza de acuerdo con PCR asimétrica (Pierce KE et ál., Methods Mol Med. Methods in Molecular Medicine 132: 65-85 (2007)). Cualquiera del cebador en exceso o cebador limitante se puede situar cadena arriba del bloqueador de amplificación. En particular, el cebador en exceso se puede situar cadena arriba del bloqueador de amplificación.

El PTO-NV y el bloqueador de amplificación se pueden diseñar para situarse en la misma hebra o diferentes hebras de la secuencia de ácidos nucleicos diana.

60 De acuerdo con una realización, la variación de nucleótidos a detectar con la presente invención es una variación por sustitución, una variación por delección o una variación por inserción.

65 De acuerdo con una realización, la secuencia de ácidos nucleicos diana que tiene variación o variaciones de nucleótido a detectar con la presente invención incluye los genes tales como K-ras, H-ras, N-ras, p53 (TP53), CDKN2A (p16), PIC3K, PTEN, RB1, gen receptor del factor de crecimiento epidérmico, BRAF, BRCA1, BRCA2, STK11, y VHL; NF1, FBN1, MSH2, MLH1 (gen asociado a trastorno dominante autosómico); CFTR, gen de hemoglobina beta, HEXA, SMN1, VAPB (gen asociado a trastorno recesivo autosómico); PHEX (gen asociado a

trastorno dominante relacionado con el cromosoma X); factor VIII, gen de distrofina, CNGA 3, CNGB3, GNAT2, gen receptor de andrógeno (AR) (gen asociado al trastorno recesivo relacionado con el cromosoma X); USP9Y (gen asociado con trastorno relacionado con el cromosoma Y); MT-ND1, MT-ND4, MT-ND4L, MT-ND6 (gen asociado con enfermedad mitocondrial); el gen del receptor del factor de crecimiento epitelial (EGFR) que codifica EGFR con respecto al fármaco (gefitinib) para tratamiento de cáncer de pulmón, el gen de proteína asociada a resistencia a múltiples fármacos (MRP) que codifica MRP con respecto al fármaco para tratamiento de cáncer de ovario, y el gen de proteína de resistencia pulmonar (LRP) con respecto al fármaco para tratamiento de cáncer de ovario; y cagPAL, vacA, iceA, babA, erp, spvC, spuB, cnf1, cnf2, eaeA, eagg, einv, stx1, stx2, y vt2e, etc.

La expresión "PTO-NV (Oligonucleótido de Sondeo y Etiquetado para Variación de Nucleótido)" usada en el presente documento se refiere a un oligonucleótido que comprende (i) una porción de dirección en la posición 3' que sirve como una sonda, (ii) una porción de etiquetado en la posición 5' con una secuencia de nucleótidos no complementaria a la secuencia de ácidos nucleicos diana, y (iii) un sitio de diferenciación de variación de nucleótido, que comprende una secuencia complementaria a la variación de nucleótido diana en el ácido nucleico diana, colocada en una parte en el extremo en la posición 5' terminal de la porción de dirección en la posición 3'. La porción de etiquetado en la posición 5' se libera por vía nucleolítica del PTO-NV después de hibridación con la secuencia de ácidos nucleicos diana. La porción de etiquetado en la posición 5' y la porción de dirección en la posición 3' en el PTO-NV se tienen que situar en un orden de la posición 5' a la posición 3'. El PTO-NV se ilustra de forma esquemática en las Figs. 1 y 3. El PTO-NV se puede apreciar como una forma de aplicación del PTO para detección de variaciones de nucleótido, que se construye por introducción del sitio de diferenciación de variación de nucleótido en la parte en el extremo 5' terminal de porción de diana en la posición 3'.

El PTO-NV comprende el sitio de diferenciación de variación de nucleótido que comprende una secuencia complementaria a la variación de nucleótidos colocada en una parte en el extremo en la posición 5' terminal de la porción de dirección en la posición 3'.

Cuando el PTO-NV se hibrida con la secuencia de ácidos nucleicos diana que tienen la variación de nucleótido complementaria al sitio de diferenciación de variación, la parte en el extremo 5' terminal de la porción de dirección en la posición 3' forma una doble hebra con la secuencia de ácidos nucleicos diana. Cuando el PTO-NV se hibrida con una secuencia de ácidos nucleicos diana que tiene una variación de nucleótido no complementaria al sitio de diferenciación de variación, la parte en el extremo 5' terminal de la porción de diana en la posición 3' no forma una doble hebra con la secuencia de ácidos nucleicos diana. Tales patrones de hibridación distintos en la variación de nucleótidos de interés son responsables de diferencias en sitios de escisión del PTO-NV, produciendo de ese modo dos tipos de fragmentos de PTO-NV para proporcionar la asociación de señales dependiendo de la presencia de la variación de nucleótidos de interés. El extremo en la parte en la posición 5' terminal de la porción de dirección en la posición 3' del PTO-NV también se puede describir como una porción individual del extremo en la posición 5' terminal que forma hebra de la porción de dirección en la posición 3' del PTO-NV cuando se hibrida con una secuencia de ácidos nucleicos diana que tiene una variación de nucleótido no complementarias al sitio de diferenciación de variación.

El sitio de diferenciación de variación de nucleótido colocado en una parte en el extremo en la posición 5' terminal de la porción de dirección en la posición 3' del PTO-NV comprende una secuencia complementaria a la variación de nucleótidos.

De acuerdo con una realización, el sitio de diferenciación de variación de nucleótido se sitúa a una distancia de 10 nucleótidos, más preferentemente 8 nucleótidos, todavía más preferentemente 6 nucleótidos, todavía aún más preferentemente 4 nucleótidos, 3 nucleótidos, 2 nucleótidos, 1 nucleótido o 0 nucleótidos de separación desde el extremo en la posición 5' terminal de la porción de dirección en la posición 3' del PTO-NV. Preferentemente, el sitio de diferenciación de variación de nucleótido se sitúa en el extremo en la posición 5' terminal de la porción de dirección en la posición 3' del PTO-NV.

La situación del sitio de diferenciación de variación de nucleótido se puede determinar considerando secuencias a detectar, tipo de nucleasas y condiciones de reacción.

El término "sitio" con referencia a cualquier sitio de diferenciación de variación de nucleótidos de sondas o sitio de variación de nucleótido en secuencias dianas se usa en el presente documento para incluir no solamente un solo nucleótido sino también una pluralidad de nucleótidos.

Preferentemente, la hibridación en la etapa (a) se realiza previamente en condiciones rigurosas de modo que la porción de dirección en la posición 3' se hibrida con la secuencia de ácidos nucleicos diana y la porción de etiquetado en la posición 5' no se indica con la secuencia de ácidos nucleicos diana.

El PTO-NV no requiere ninguna longitud específica. Por ejemplo, la longitud del PTO-NV puede ser de 15-150 nucleótidos, 15-100 nucleótidos, 15-80 nucleótidos, 15-60 nucleótidos, 15-40 nucleótidos, 20-150 nucleótidos, 20-100 nucleótidos, 20-80 nucleótidos, 20-60 nucleótidos, 20-50 nucleótidos, 30-150 nucleótidos, 30-100 nucleótidos, 30-80 nucleótidos, 30-60 nucleótidos, 30-50 nucleótidos, 35-100 nucleótidos, 35-80 nucleótidos, 35-60 nucleótidos, o

35-50 nucleótidos. La porción de dirección en la posición 3' del PTO-NV puede tener cualquier longitud siempre y cuando se hibride de forma específica con secuencias de ácidos nucleicos diana. Por ejemplo, la porción de dirección en la posición 3' del PTO-NV puede tener una longitud de 10-100 nucleótidos, 10-80 nucleótidos, 10-50 nucleótidos, 10-40 nucleótidos, 10-30 nucleótidos, 15-100 nucleótidos, 15-80 nucleótidos, 15-50 nucleótidos, 15-40 nucleótidos, 15-30 nucleótidos, 20-100 nucleótidos, 20-80 nucleótidos, 20-50 nucleótidos, 20-40 nucleótidos o 20-30 nucleótidos. La porción de etiquetado en la posición 5' puede tener cualquier longitud siempre y cuando se hibride con la porción de captura del CTO y a continuación se extienda. Por ejemplo, la porción de etiquetado en la posición 5' del PTO-NV puede tener una longitud de 5-50 nucleótidos, 5-40 nucleótidos, 5-30 nucleótidos, 5-20 nucleótidos, 10-50 nucleótidos, 10-40 nucleótidos, 10-30 nucleótidos, 10-20 nucleótidos, 15-50 nucleótidos, 15-40 nucleótidos, 15-30 nucleótidos o 15-20 nucleótidos.

De acuerdo con una realización, el PTO-NV se bloquea en su extremo en la posición 3' terminal para prohibir su extensión. El bloqueo se puede conseguir de acuerdo con métodos convencionales. Por ejemplo, el bloqueo se puede realizar mediante la adición al grupo 3'-hidroxilo del último nucleótido de un resto tímico tal como biotina, etiquetas, un grupo fosfato, grupo alquilo, conector no nucleótido, fosforotioato o alcano-diol. Como alternativa, el bloqueo se puede realizar retirando el grupo 3' del último nucleótido o usando un nucleótido sin grupo 3'-hidroxilo tal como didesoxinucleótido.

Como alternativa, el PTO se puede diseñar para que tenga una estructura de horquilla.

El cebador cadena arriba se sitúa cadena arriba del PTO-NV. El cebador cadena arriba induce a través de su hebra extendida la escisión del PTO-NV con una enzima que tiene una actividad de 5' nucleasa.

El presente método, la expresión "el cebador cadena arriba" se determina con referencia a la situación del PTO-NV y por lo tanto el cebador cadena arriba se sitúa cadena arriba del PTO-NV.

De acuerdo con una realización, el cebador cadena arriba, el cebador cadena abajo y/o porción de etiquetado en la posición 5' del PTO-NV tienen una estructura de oligonucleótido de cebado doble (DPO) desarrollada por el presente inventor. Los oligonucleótidos que tienen la estructura de DPO muestran una especificidad mediana significativamente mejorada en comparación con cebadores y sondas convencionales (véase el documento WO 2006/095981; Chun et al., Dual priming oligonucleotide system for the multiplex detection of respiratory viruses and SNP genotyping of CYP2C19 gene, *Nucleic Acid Research*, 35: 6e40 (2007)).

De acuerdo con una realización, la porción de dirección en la posición 3' del PTO-NV tiene una estructura de oligonucleótido de doble especificidad modificada (mDSO) desarrollada por el presente inventor. La estructura de oligonucleótido de doble especificidad modificada (mDSO) muestra una especificidad de diana significativamente mejorada en comparación con las sondas convencionales (véase el documento WO 2011/028041).

El PTO-NV y el bloqueador de amplificación se pueden diseñar para situarse en la misma hebra o diferentes hebras de la secuencia de ácidos nucleicos diana.

En la Fig. 4, el PTO-NV y el bloqueador de amplificación se sitúan en la misma hebra de la secuencia de ácidos nucleicos diana. El sitio de diferenciación de variación de nucleótido del PTO-NV comprende una secuencia complementaria a la variación de nucleótido diana en el ácido nucleico diana y el bloqueador de amplificación comprende una secuencia complementaria a la variación de nucleótido no diana en el ácido nucleico diana. El PTO-NV se hibrida con variación de nucleótido diana que contiene molde, y el PTO-NV se escinde junto con la extensión del cebador cadena arriba, formando la hebra extendida en el CTO. Por otro lado, el bloqueador de amplificación se hibrida con la variación de nucleótido no diana que contiene molde, y la extensión del cebador cadena arriba se evita con el bloqueador de amplificación. Además, la existencia del bloqueador de amplificación en la variación de nucleótido no diana que contiene molde inhibe la hibridación del PTO-NV, evitando la hibridación de PTO-NV con la variación de nucleótido no diana que contiene molde y su escisión ineficaz. Ajustando las condiciones de reacción y secuencias del bloqueador de amplificación, se puede hacer que la hibridación del bloqueador de amplificación con el ADN de tipo silvestre será más favorable que la del PTO-NV.

Como alternativa, el PTO-NV y el bloqueador de amplificación se pueden diseñar para situarse en diferentes hebras de la secuencia de ácidos nucleicos diana entre sí.

Etapa (b): Liberación de un fragmento del PTO-NV

A continuación, el producto resultante de la etapa (a) se pone en contacto con una enzima que tiene una actividad de 5' nucleasa en condiciones para la escisión del PTO-NV. El cebador cadena arriba induce a través de su hebra extendida la escisión del PTO-NV por la enzima que tiene la actividad de 5' nucleasa.

La expresión "condiciones para escisión del PTO-NV" usada en el presente documento se refiere a condiciones suficientes para digerir el PTO-NV hibridado con la secuencia de ácidos nucleicos diana por la enzima que tiene la actividad de 5' nucleasa, tales como temperatura, pH, fuerza iónica, tampón, longitud y secuencia de

oligonucleótidos y enzimas. Por ejemplo, cuando se usa Taq ADN polimerasa como la enzima que tiene la actividad de 5' nucleasa, las condiciones para escisión del PTO incluyen tampón Tris-HCl, KCl, MgCl<sub>2</sub> y temperatura.

5 La hibridación del bloqueador de amplificación con la secuencia de ácidos nucleicos diana que tiene la variación de nucleótido no diana inhibe la extensión del cebador situado cadena arriba del bloqueador de amplificación, bloqueando de ese modo la amplificación de la secuencia de ácidos nucleicos diana que tiene la variación de nucleótido no diana.

10 Cuando el PTO-NV se hibrida con la secuencia de ácidos nucleicos diana (es decir, molde de emparejamiento) que tiene la variación de nucleótido diana complementaria al sitio de diferenciación de variación, y la parte en el extremo 5' terminal de la porción de dirección en la posición 3' forma una doble hebra con la secuencia de ácidos nucleicos diana para inducir la escisión desde un primer sitio de escisión inicial, se libera un primer fragmento.

15 Cuando el PTO-NV se hibrida con una secuencia de ácidos nucleicos diana (es decir, molde con falta de coincidencias) que tiene una variación de nucleótido no diana no complementaria al sitio de diferenciación de variación, y la parte en el extremo 5' terminal de la porción de dirección en la posición 3' no forma una doble hebra con la secuencia de ácidos nucleicos diana para inducir la escisión desde un segundo sitio de escisión inicial situado cadena abajo del primer sitio de escisión inicial, se libera un segundo fragmento; en el que el segundo fragmento comprende una porción adicional en el extremo en la posición 3' terminal que permite que el segundo fragmento sea diferente al primer fragmento.

20

Cuando la secuencia de ácidos nucleicos diana no está presente en una muestra, la escisión del PTO-NV no se produce.

25 Como tal, las diferencias en sitios de escisión y tipos de fragmentos de PTO-NV generados dan como resultado diferentes patrones de extensión dependiendo de la presencia y ausencia de la variación de nucleótidos de interés en la secuencia de ácidos nucleicos diana, contribuyendo a la detección diferencial de la variación de nucleótidos en la secuencia de ácidos nucleicos diana.

30 Un sitio de escisión inicial del PTO-NV se ve influido por el tipo de 5' nucleasas, el sitio de hibridación del cebador cadena arriba y condiciones de escisión.

35 Un sitio de escisión inicial mediante polimerasa dependiente de molde que tiene actividad de 5' nucleasa con extensión de cebadores cadena arriba generalmente se sitúa en una dirección de la posición 5' a la posición 3' en un nucleótido inicial de una doble hebra (es decir, sitio de bifurcación) en estructuras que incluyen una sola hebra y una doble hebra o a 1-2 nucleótidos de separación del nucleótido inicial. Mediante la reacción de escisión, se producen fragmentos que comprenden la porción de etiquetado en la posición 5' y una parte de la porción de dirección en la posición 3'.

40 La expresión "un primer sitio de escisión inicial" usada en el presente documento en conjunto con el PTO-NV se refiere a un sitio de escisión del PTO-NV que se está escindiendo en primer lugar cuando el PTO-NV se hibrida con la secuencia de ácidos nucleicos diana que tiene la variación de nucleótidos complementaria al sitio de diferenciación de variación. La expresión usada "un segundo sitio de escisión inicial" en el presente documento en conjunto con el PTO-NV se refiere a un sitio de escisión del PTO-NV que se está escindiendo en primer lugar

45 cuando el PTO-NV se hibrida con una secuencia de ácidos nucleicos diana que tiene una variación de nucleótido no complementaria al sitio de diferenciación de variación.

50 La expresión "un primer fragmento" usada en el presente documento se refiere a un fragmento producido después de escisión en el primer sitio de escisión inicial. La expresión se usa indistintamente con "un primer segmento" y "un primer fragmento de PTO-NV". En el presente documento, la expresión "un segundo fragmento" se refiere a un fragmento producido después de escisión en el segundo sitio de escisión inicial. La expresión se usa indistintamente con "un segundo segmento" y "un segundo fragmento de PTO-NV".

55 En particular, cada uno del primer fragmento y el segundo fragmento comprende la porción de etiquetado en la posición 5' o una parte de la porción de etiquetado en la posición 5'.

60 La escisión se puede producir sucesivamente después de la escisión del primer sitio de escisión inicial (o el segundo sitio de escisión inicial) dependiendo de los métodos de escisión usados. Por ejemplo, cuando se usa reacción de escisión de 5' nucleasa junto con extensión de cebadores cadena arriba, el sitio de escisión inicial y su secuencia excesiva se escinden.

65 De acuerdo con una realización, un sitio de escisión inicial dependiente de la extensión de cebadores cadena arriba se puede colocar en una dirección de la posición 5' a la posición 3' en un nucleótido inicial de una doble hebra (es decir, sitio de bifurcación).

- Como se muestra en la Fig. 3 que representa un ejemplo de la presente invención, el sitio de diferenciación de variación de nucleótido se sitúa en el extremo en la posición 5' terminal de la parte en el extremo 5' terminal de la porción de dirección en la posición 3' del PTO-NV. En tal caso, el primer sitio de escisión inicial se sitúa inmediatamente adyacente, en una dirección de la posición 5' a la posición 3', con respecto a la parte en el extremo 5' terminal de la porción de dirección en la posición 3'. En otras palabras, el primer sitio de escisión inicial se sitúa inmediatamente adyacente, en una dirección en la posición 3', con respecto al sitio de diferenciación de variación de nucleótido. El segundo sitio de escisión inicial se sitúa generalmente a 1 nucleótido de separación, en una dirección en la posición 3', desde el sitio de diferenciación de variación de nucleótido.
- Como alternativa, el sitio de diferenciación de variación de nucleótido se puede situar a 1 nucleótido de separación del extremo en la posición 5' terminal de la parte en el extremo 5' terminal de la porción de dirección en la posición 3'. En tal caso, el primer sitio de escisión inicial se sitúa inmediatamente adyacente, en una dirección en la posición 5', con respecto al sitio de diferenciación de variación de nucleótido. El segundo sitio de escisión inicial generalmente se sitúa a 1 nucleótido de separación, en una dirección en la posición 3', desde el sitio de diferenciación de variación de nucleótido.
- De acuerdo con una realización, el PTO-NV tiene una porción de bloqueador que contiene un bloqueador resistente a la escisión por la enzima que tiene actividad de 5' nucleasa y la porción de bloqueador se usa para controlar un sitio de escisión inicial y/o escisiones sucesivas.
- De acuerdo con una realización, el PTO-NV tiene una porción de bloqueador que contiene como un bloqueador al menos un nucleótido resistente a la escisión por la enzima que tiene actividad de 5' nucleasa.
- Por ejemplo, para inducir la escisión en el sitio de unión entre una porción de hibridación del PTO-NV (porción de dirección en la posición 3') y una porción de no hibridación (porción de etiquetado en la posición 5'), la parte en el extremo 5' terminal de porción de dirección en la posición 3' de PTO-NV se puede bloquear con bloqueadores.
- El número de bloqueadores contenidos en la porción de bloqueador pueden estar limitado, preferentemente, 1-10, más preferentemente 2-10, todavía más preferentemente 3-8, lo más preferentemente 3-6 bloqueadores. Los bloqueadores en el PTO pueden estar presentes de una manera continua o intermitente, preferentemente de una manera continua. Los nucleótidos como bloqueadores con una estructura principal resistente a la actividad de 5' nucleasa incluyen uno cualquiera conocido para alguien con experiencia en la materia. Por ejemplo, incluye diversos enlaces de fosforotioato, enlaces de fosfonato, enlaces de fosforoamidato y modificaciones de carbohidratos en la posición 2'. De acuerdo con una realización más preferente, los nucleótidos que tienen una estructura principal resistente en la 5' nucleasa incluyen enlace de fosforotioato, enlace de fosfotriéster de alquilo, enlace de fosfotriéster de arilo, enlace de fosfonato de alquilo, enlace de fosfonato de arilo, enlace de hidrogenofosfonato, enlace de fosforoamidato de alquilo, enlace de fosforoamidato de arilo, enlace de fosforoselenato, modificación de 2'-O-aminopropilo, modificación de 2'-O-alquilo, modificación de 2'-O-alilo, modificación de 2'-O-butilo, oligodesoxinucleótido  $\alpha$ -anomérico y modificación de 1-(4'-tio- $\beta$ -D-ribofuranosilo).
- De acuerdo con una realización, un nucleótido como un bloqueador incluye LNA (ácido nucleico bloqueado).
- El extremo en la parte en la posición 5' terminal que comprende el sitio de diferenciación de variación de nucleótido puede estar formado por una secuencia que se puede hibridar con la secuencia de ácidos nucleicos diana. Como alternativa, el extremo en la parte en la posición 5' puede comprender parcialmente una secuencia no hibridable. La introducción de una secuencia no hibridable en el extremo en la parte en la posición 5' terminal es muy ventajosa con respecto a la formación de una sola hebra del extremo en la parte en la posición 5' terminal cuando el PTO-NV se hibrida con una secuencia de ácidos nucleicos diana que tiene una variación de nucleótido no complementaria al sitio de diferenciación de variación de nucleótido.
- De acuerdo con una realización, la parte en el extremo 5' terminal de la porción de dirección en la posición 3' del PTO-NV comprende un resto de no emparejamiento de bases situado a 1-10 nucleótidos (más preferentemente 1-5 nucleótidos) de separación del sitio de diferenciación de variación de nucleótido.
- El resto de no emparejamiento de bases evita que la parte en el extremo 5' terminal de la porción de dirección en la posición 3' forme una doble hebra con la secuencia de nucleótidos diana cuando el PTO-NV se hibrida con la secuencia de ácidos nucleicos diana que tiene la variación de nucleótidos no complementaria al sitio de diferenciación de variación.
- De acuerdo con una realización, el resto de no emparejamiento de bases no inhibe la formación de una doble hebra entre el extremo en la parte en la posición 5' terminal y la secuencia de ácidos nucleicos diana cuando el PTO-NV se hibrida con la secuencia de ácidos nucleicos diana que tiene la variación de nucleótidos complementaria al sitio de diferenciación de variación de nucleótido.
- De acuerdo con una realización, el resto de no emparejamiento de bases mejora la diferenciación entre el primer sitio de escisión inicial y el segundo sitio de escisión inicial. Por ejemplo, cuando los sitios de escisión no se llama

- diferenciar en un molde de emparejamiento y molde con falta de coincidencias mediante diferencia en el sitio de diferenciación de variación debido a ninguna diferencia en los patrones de hibridación de la parte en el extremo 5' terminal de la porción de dirección en la posición 3' del PTO-NV, el uso del resto de no emparejamiento de bases hace que los patrones de hibridación se lleguen a diferenciar. Además, incluso cuando la parte en el extremo 5' terminal de la porción de dirección en la posición 3' del PTO-NV muestra patrones de hibridación diferentes en un molde de emparejamiento y molde con falta de coincidencias mediante diferencia en el sitio de diferenciación de variación, el uso del resto de no emparejamiento de bases permite dar una porción del extremo en la posición 3' terminal mucho más larga del segundo fragmento quede el primer fragmento, evitando de ese modo completamente la extensión del segundo fragmento en el CTO.
- El uso del resto de no emparejamiento de bases puede mejorar el ensayo de AB-VD PTOCE.
- De acuerdo con una realización, el uso del resto de no emparejamiento de bases (por ejemplo, nucleótido con falta de coincidencias artificial) aumenta el potencial de discriminación del PTO-NV con respecto a variaciones de nucleótido.
- De acuerdo con una realización, el reconocimiento diferencial por la enzima que tiene la actividad de 5' nucleasa entre el primer sitio de escisión inicial y el segundo sitio de escisión inicial mejorar con la diferenciación impuesta por el resto de no emparejamiento de bases. La diferenciación puede mejorar por la distancia entre el primer sitio de escisión inicial y el segundo sitio de escisión inicial producida por el resto de no emparejamiento de bases. De acuerdo con una realización, el resto de no emparejamiento de bases amplía la distancia entre el primer sitio de escisión inicial y el segundo sitio de escisión inicial.
- De acuerdo con una realización, la introducción de una secuencia de resto de no emparejamiento de bases permite que el segundo sitio de escisión inicial se ajuste.
- Preferentemente, el resto de no emparejamiento de bases se sitúa cadena abajo del sitio de diferenciación de variación de nucleótido.
- Por ejemplo, cuando se introduce un nucleótido con falta de coincidencias como un resto de no emparejamiento de bases en una posición a 2 nucleótidos de separación, en una dirección en la posición 3', desde el sitio de diferenciación de variación de nucleótido, el segundo sitio de escisión inicial se ajusta a una posición a 2 nucleótidos de separación del sitio de diferenciación de variación de nucleótido. En el caso de no usar el nucleótido con falta de coincidencias, el segundo sitio de escisión inicial se sitúa a 1 nucleótido de separación del sitio de diferenciación de variación de nucleótido. Es decir, el resto de no emparejamiento de bases puede ampliar la distancia entre el primer sitio de escisión inicial y el segundo sitio de escisión inicial.
- El resto de no emparejamiento de bases incluye cualquier resto que no forme un par de bases entre secuencias de ácidos nucleicos diana. Preferentemente, el resto de no emparejamiento de bases es (i) un nucleótido que comprende una base con falta de coincidencias artificial, una base de no emparejamiento de bases modificada para que sea incapaz de emparejamiento de bases o una base universal, (ii) un nucleótido de no emparejamiento de bases modificado para que sea incapaz de emparejamiento de bases, o (iii) un compuesto químico de no emparejamiento de bases.
- Por ejemplo, el resto de no emparejamiento de bases incluye grupo alquileo, ribofuranosil naftaleno, desoxi ribofuranosil naftaleno, metafosfato, enlace de fosforotioato, enlace de fosfotriéster de alquilo, enlace de fosfotriéster de arilo, enlace de fosfonato de alquilo, enlace de fosfonato de arilo, enlace de hidrogeno fosfonato, enlace de fosforoamidato de alquilo y un enlace de fosforoamidato de arilo. Como restos de no emparejamiento de bases también se usan espaciadores de carbono convencionales. Las bases universales como restos de no emparejamiento de bases son útiles para ajustar los sitios de escisión del PTO-NV.
- Como pares de bases que contienen bases universales tales como desoxiinosina, 1-(2'-desoxi-beta-D-ribofuranosil)-3-nitropirrol y 5-nitroindol tienen una resistencia a la unión menor que las que se encuentran entre las bases naturales, se pueden usar bases universales como restos de no emparejamiento de bases en ciertas condiciones de hibridación.
- El resto de no emparejamiento de bases introducido en el extremo en la parte en la posición 5' terminal tiene preferentemente 1-5, más preferentemente 1-2 restos. Una pluralidad de restos de no emparejamiento de bases en el extremo en la parte en la posición 5' terminal puede estar presente de una manera consecutiva o intermitente. Preferentemente, el resto de no emparejamiento de bases tiene 2-5 restos consecutivos.
- Preferentemente, el resto de no emparejamiento de bases es un compuesto químico de no emparejamiento de bases.
- De acuerdo con una realización, el sitio de diferenciación de variación de nucleótido y el resto de no emparejamiento de bases del PTO-NV se sitúan a 10 nucleótidos (más preferentemente 8 nucleótidos, 7 nucleótidos, 6 nucleótidos, 5

nucleótidos, 4 nucleótidos, 3 nucleótidos, 2 nucleótidos o 1 nucleótido, todavía más preferentemente 1 nucleótido) de separación del extremo en la posición 5' terminal de la porción de dirección en la posición 3'.

5 De acuerdo con una realización, cuando el PTO-NV se hibrida con el molde con falta de coincidencias, el segundo sitio de escisión inicial comprende un sitio inicial de una doble en la (es decir, sitio de bifurcación) en estructuras que incluyen una sola hebra y una doble hebra.

10 De acuerdo con una realización, el PTO-NV tiene una porción de bloqueador que contiene como un bloqueador al menos un nucleótido resistente a la escisión por la enzima que tiene actividad de 5' nucleasa y la porción de bloqueador se sitúa para controlar el sitio de escisión inicial o para evitar la escisión en un sitio o sitios.

15 El término "parte" usado en conjunto con el PTO-NV o CTO tal como la parte de la porción de etiquetado en la posición 5' del PTO-NV, la parte en el extremo 5' terminal de la porción de dirección en la posición 3' del PTO-NV y la parte en el extremo 5' terminal de la porción de captura del CTO se refiere a una secuencia de nucleótidos formada por 1-40, 1-30, 1-20, 1-15, 1-10 o 1-5 nucleótidos, en particular, 1, 2, 3 o 4 nucleótidos.

20 De acuerdo con una realización, la enzima que tiene la actividad de 5' nucleasa ex ADN polimerasa que tiene una actividad de 5' nucleasa o FEN nucleasa, más preferentemente una ADN polimerasa termoestable que tiene una actividad de 5' nucleasa.

25 Una ADN polimerasa adecuada que tiene una actividad de 5' nucleasa en la presente invención es una ADN polimerasa termoestable obtenida a partir de una diversidad de especies bacterianas, que incluyen *Thermus aquaticus* (Taq), *Thermus thermophilus* (Tth), *Thermus filiformis*, *Thermis flavus*, *Thermococcus litoralis*, *Thermus antranikianii*, *Thermus caldophilus*, *Thermus chliarophilus*, *Thermus flavus*, *Thermus igniterrae*, *Thermus lacteus*,  
30 *Thermus oshimai*, *Thermus ruber*, *Thermus rubens*, *Thermus scotoductus*, *Thermus silvanus*, especies Z05 de *Thermus*, especies sps 17 de *Thermus*, *Thermus thermophilus*, *Thermotoga maritima*, *Thermotoga neapolitana*, *Thermosipho africanus*, *Thermococcus litoralis*, *Thermococcus barossi*, *Thermococcus gorgonarius*, *Thermotoga maritima*, *Thermotoga neapolitana*, *Thermosipho africanus*, *Pirococcus woesei*, *Pirococcus horikoshii*, *Pirococcus abyssii*, *Pirodictium occultum*, *Aquifex pirophilus* y *Aquifex aeolicus*. Más preferentemente, la ADN polimerasa termoestable es Taq polimerasa.

De acuerdo con una realización, una polimerasa dependiente de molde se usa para extensión del cebador cadena arriba y cadena abajo.

35 De acuerdo con una realización, la polimerasa dependiente de molde para extensión de los cebadores es idéntica a la enzima que tiene la actividad de 5' nucleasa o la polimerasa dependiente de molde para extensión de los cebadores es diferente de la enzima que tiene la actividad de 5' nucleasa.

40 Etapa (c): Hibridación del fragmento liberado del PTO-NV con CTO

El fragmento liberado del PTO-NV se hibrida con un CTO (Oligonucleótido de Captura y Formación de Molde).

45 El CTO comprende en una dirección de la posición 3' a la posición 5' (i) una porción de captura que comprende una secuencia de nucleótidos complementaria a la porción de etiquetado en la posición 5' o una parte de la porción de etiquetado en la posición 5' del PTO-NV y (ii) una porción de formación de molde que comprende una secuencia de nucleótidos no complementaria a la porción de etiquetado en la posición 5' y la porción de dirección en la posición 3' del PTO-NV.

50 El primer fragmento y el segundo fragmento tienen comúnmente una secuencia esa credibilidad con la porción de captura del CTO y por lo tanto uno de ellos se hibrida con el CTO.

El segundo fragmento producido cuando se hibrida con el molde con falta de coincidencias comprende una porción en el extremo en la posición 3' terminal adicional que es diferente del primer fragmento producido cuando se hibridar con el molde de emparejamiento.

55 De acuerdo con una realización, el CTO tiene una secuencia seleccionada de modo que el CTO no se hibrida con la porción adicional en el extremo 3' terminal del segundo fragmento para evitar la extensión del segundo fragmento cuando el segundo fragmento se hibrida con la de captura del CTO. Por ejemplo, la secuencia del CTO se puede seleccionar de modo que el CTO tenga un nucleótido o nucleótidos con falta de coincidencias opuesto a la porción en la posición 3' terminal adicional del segundo fragmento. Como alternativa, se pueden usar bases universales en lugar del nucleótido con falta de coincidencias dependiendo de las condiciones de reacción.

60 El primer sitio de escisión inicial (o el segundo sitio de escisión inicial) pueden no estar fijos pero en su lugar pueden ser múltiples en una condición. Por ejemplo, los sitios de escisión inicial se pueden situar en una dirección de la posición 5' a la posición 3' en un nucleótido inicial de una doble hebra (es decir, sitio de bifurcación) en estructuras que incluyen una sola hebra y una doble hebra y a 1-2 nucleótidos de separación del nucleótido inicial. En tal caso,

preferentemente, la secuencia del CTO se selecciona de modo que el fragmento más corto liberado por la primera escisión inicial se extienda de forma selectiva en la presente invención para generar la hebra extendida indicativa de la presencia de la variación de nucleótidos.

5 La porción de formación de molde del CTO puede comprender cualquier secuencia siempre y cuando no sea complementaria a la porción de etiquetado en la posición 5' y la porción de dirección en la posición 3' del PTO-NV. Además, la porción de formación de molde puede comprender cualquier secuencia siempre y cuando pueda actuar como un molde para la extensión del primer fragmento liberado del PTO-NV.

10 La longitud del CTO puede variar ampliamente. Por ejemplo, el CTO tiene una longitud de 7-1000 nucleótidos, 7-500 nucleótidos, 7-300 nucleótidos, 7-100 nucleótidos, 7-80 nucleótidos, 7-60 nucleótidos, 7-40 nucleótidos, 15-1000 nucleótidos, 15-500 nucleótidos, 15-300 nucleótidos, 15-100 nucleótidos, 15-80 nucleótidos, 15-60 nucleótidos, 15-40 nucleótidos, 20-1000 nucleótidos, 20-500 nucleótidos, 20-300 nucleótidos, 20-100 nucleótidos, 20-80 nucleótidos, 20-60 nucleótidos, 20-40 nucleótidos, 30-1000 nucleótidos, 30-500 nucleótidos, 30-300 nucleótidos, 30-100 nucleótidos, 30-80 nucleótidos, 30-60 nucleótidos o 30-40 nucleótidos. La porción de captura del CTO puede tener cualquier longitud siempre y cuando se hibride de forma específica con el fragmento liberado del PTO. Por ejemplo, la porción de captura del CTO tiene una longitud de 5-100 nucleótidos, 5-60 nucleótidos, 5-40 nucleótidos, 5-30 nucleótidos, 5-20 nucleótidos, 10-100 nucleótidos, 10-60 nucleótidos, 10-40 nucleótidos, 10-30 nucleótidos, 10-20 nucleótidos, 15-100 nucleótidos, 15-60 nucleótidos, 15-40 nucleótidos, 15-30 nucleótidos o 15-20 nucleótidos. La porción de formación de molde del CTO puede tener cualquier longitud siempre y cuando pueda actuar como un molde para la extensión del primer fragmento liberado del PTO. Por ejemplo, la porción de formación de molde del CTO tiene una longitud de 1-900 nucleótidos, 1-400 nucleótidos, 1-300 nucleótidos, 1-100 nucleótidos, 1-80 nucleótidos, 1-60 nucleótidos, 1-40 nucleótidos, 1-20 nucleótidos, 2-900 nucleótidos, 2-400 nucleótidos, 2-300 nucleótidos, 2-100 nucleótidos, 2-80 nucleótidos, 2-60 nucleótidos, 2-40 nucleótidos, 2-20 nucleótidos, 5-900 nucleótidos, 5-400 nucleótidos, 5-300 nucleótidos, 5-100 nucleótidos, 5-80 nucleótidos, 5-60 nucleótidos, 5-40 nucleótidos, 5-30 nucleótidos, 10-900 nucleótidos, 10-400 nucleótidos, 10-300 nucleótidos, 15-900 nucleótidos, 15-100 nucleótidos, 15-80 nucleótidos, 15-60 nucleótidos, 15-40 nucleótidos o 15-20 nucleótidos.

15 El extremo en la posición 3' terminal del CTO puede tener un 3'-OH terminal. De acuerdo con una realización, el extremo en la posición 3' terminal del CTO se bloquea para prohibir su extensión. El bloqueo que no se puede extender del CTO se puede conseguir de acuerdo con métodos convencionales.

20 El primer fragmento liberado del PTO-NV se hibrida con el CTO, proporcionando una forma con una extensión adecuada del primer fragmento. Aunque un PTO-NV no digerido también se hibrida con la porción de captura del CTO a través de su porción de etiquetado en la posición 5', su porción de dirección en la posición 3' no se hibrida al CTO que prohíbe la formación de un ácido nucleico bicatenario extendido.

25 La hibridación en la etapa (c) se puede describir con detalle por referencia de excepciones en la etapa (a).

30 Etapa (d): Extensión del fragmento

La reacción de extensión se realiza usando el producto resultante de la etapa (c) y una ácido nucleico polimerasa dependiente de molde.

35 Cuando el primer fragmento se hibrida con la porción de captura del CTO, se extiende para formar una hebra extendida que comprende una secuencia extendida complementaria a la porción de formación de molde del CTO. Cuando el segundo fragmento se hibrida con la porción de captura del CTO, no se extiende.

40 La expresión "secuencia extendida" usada en el presente documento en conjunto con la hebra extendida se refiere solamente a una secuencia recién extendida que es una porción de la hebra extendida excepto el primer fragmento. La hebra extendida comprende el primer fragmento y la secuencia extendida.

45 En cierta realización, la hebra extendida del primer fragmento y el CTO forman un ácido nucleico bicatenario extendido en la etapa (d).

50 La expresión "ácido nucleico bicatenario extendido" usada en el presente documento se refiere a un híbrido formado por reacción de extensión en la que el primer fragmento hibridado con la porción de captura del CTO se extiende usando la porción de formación de molde del CTO como un molde y la ácido nucleico polimerasa dependiente de molde.

55 El ácido nucleico bicatenario extendido tiene un valor de  $T_m$  diferente desde el híbrido entre el PTO-NV no escindido y el CTO. En particular, el ácido nucleico bicatenario extendido tiene un valor de  $T_m$  más elevado que el híbrido entre el PTO no escindido y el CTO.

60 El valor de  $T_m$  del ácido nucleico bicatenario extendido se puede ajustar con (i) una secuencia y/o longitud del primer fragmento, (ii) una secuencia y/o longitud del CTO o (iii) la secuencia y/o longitud del primer fragmento y la

secuencia y/o longitud del CTO. El valor de  $T_m$  ajustable del ácido nucleico bicatenario extendido se puede usar para proporcionar una señal diana indicativa de la presencia de la hebra extendida por fusión del ácido nucleico bicatenario extendido en la etapa (e).

5 El término " $T_m$ " usado en el presente documento se refiere a una temperatura de fusión a la que la mitad de una población de moléculas de ácido nucleico bicatenario disocia a moléculas monocatenarias. El valor de  $T_m$  se determina por la longitud y el contenido de G/C de nucleótidos hibridados. El valor de  $T_m$  se puede calcular con métodos convencionales tales como la regla de Wallace (R.B. Wallace, et ál., *Nucleic Acids Research*, 6: 3543-3547 (1979)) y el método de vecino más próximo (SantaLucia J. Jr., et ál., *Biochemistry*, 35: 3555-3562 (1996)); Sugimoto N., et ál., *Nucleic Acids Res.*, 24: 4501-4505 (1996)).

De acuerdo con una realización, el valor de  $T_m$  se refiere a valores reales de  $T_m$  en condiciones de reacción practicadas realmente.

15 La ácido nucleico polimerasa dependiente de molde usada en la etapa (d) puede incluir cualquier ácido nucleico polimerasa, por ejemplo, el fragmento Klenow de la ADN polimerasa I de *E. coli*, una ácido nucleico polimerasa termoestable una ADN polimerasa de bacteriófago T7. Preferentemente, la polimerasa es una ADN polimerasa termoestable que se puede obtener a partir de una diversidad de especies de bacterias, que incluyen *Thermus aquaticus* (*Taq*), *Thermus thermophilus* (*Tth*), *Thermus filiformis*, *Thermis flavus*, *Thermococcus litoralis*, *Thermus antranikianii*, *Thermus caldophilus*, *Thermus chliarophilus*, *Thermus flavus*, *Thermus igniterrae*, *Thermus lacteus*, *Thermus oshimai*, *Thermus ruber*, *Thermus rubens*, *Thermus scotoductus*, *Thermus silvanus*, especies Z05 de *Thermus*, especies sps 17 de *Thermus*, *Thermus thermophilus*, *Thermotoga maritima*, *Thermotoga neapolitana*, *Thermosipho africanus*, *Thermococcus litoralis*, *Thermococcus barossi*, *Thermococcus gorgonarius*, *Thermotoga maritima*, *Thermotoga neapolitana*, *Thermosipho africanus*, *Pirococcus furiosus* (*Pfu*), *Pirococcus woesei*, *Pirococcus horikoshii*, *Pirococcus abyssi*, *Pirodictium occultum*, *Aquifex pyrophilus* y *Aquifex aeolicus*. Más preferentemente, la ácido nucleico polimerasa dependiente de molde es *Taq* polimerasa.

De acuerdo con una realización, la enzima que tiene la actividad de 5' nucleasa usada en la etapa (b) es idéntica a la ácido nucleico polimerasa dependiente de molde usada en la etapa (d). En particular, la enzima que tiene la actividad de 5' nucleasa usada en la etapa (b), la ácido nucleico polimerasa dependiente de molde usada para extensión del cebador cadena arriba y la ácido nucleico polimerasa dependiente de molde usada en la etapa (d) son idénticas entre sí.

35 Generalmente, la extensión de cebadores puede controlar por hibridación entre una parte del extremo en la posición 3' terminal de cebadores y un molde. Ajustando las secuencias de cebador y las condiciones de reacción (por ejemplo, temperatura de hibridación), se puede permitir la extensión de los cebadores que tienen, en su parte en el extremo en la posición 3' terminal, 1-3 nucleótidos con falta de coincidencias. Como alternativa, la extensión de los cebadores se puede permitir solamente cuando tengan una secuencia perfectamente complementaria a secuencias diana.

De acuerdo con una realización, la secuencia del CTO se selecciona de modo que cualquiera del primer fragmento o el segundo fragmento se extienda de forma selectiva.

De acuerdo con una realización, la extensión del fragmento se realiza en condiciones de modo que no se produzca la extensión incluso cuando una sola falta de coincidencias esté presente en la parte en el extremo en la posición 3' terminal del fragmento.

#### Etapa (e): Detección de la Hebra Extendida

50 La hebra extendida se detecta después de la reacción de extensión. La presencia de la hebra extendida indica la presencia de la variación de nucleótidos complementaria al sitio de diferenciación de nucleótido del PTO-NV.

En la presente invención, se puede formar un híbrido entre el PTO-NV no escindido y el CTO o entre el segundo fragmento y el CTO. La diferenciación del ácido nucleico bicatenario extendido del híbrido entre un PTO-NV no escindido y el CTO que se describe a continuación también se puede aplicar a la diferenciación del ácido nucleico bicatenario extendido del híbrido entre el segundo fragmento y el CTO.

#### Detección de Híbrido Extendido mediante Análisis de Fusión o Hibridación

60 De acuerdo con una realización, la detección en la etapa (e) se realiza de acuerdo con el ensayo de PTOCE que comprende un análisis de fusión usando señales del ácido nucleico bicatenario extendido entre la hebra extendida y el CTO (véase el documento WO 2012/096523).

De acuerdo con una realización, la hebra extendida del primer fragmento y el CTO forman un ácido nucleico bicatenario extendido en la etapa (d); en el que el ácido nucleico bicatenario extendido tiene un valor de  $T_m$  ajustable por (i) una secuencia y/o longitud del primer fragmento, (ii) una secuencia y/o longitud del CTO o (iii) la secuencia y/o

longitud del primer fragmento y la secuencia y/o longitud del CTO; en el que el ácido nucleico bicatenario extendido proporciona una señal diana por (i) al menos una etiqueta unida al primer fragmento y/o CTO, (ii) una etiqueta incorporada en el ácido nucleico bicatenario extendido durante la reacción de extensión, (iii) al menos una etiqueta unida al primer fragmento y/o CTO y una etiqueta incorporada en el ácido nucleico bicatenario extendido durante la reacción de extensión o (iv) etiqueta de intercalado; y en el que la presencia de la hebra extendida se detecta por medición de la señal diana del ácido nucleico bicatenario extendido de acuerdo con un análisis de fusión o un análisis de hibridación para el ácido nucleico bicatenario extendido.

La expresión "análisis de fusión" usada en el presente documento se refiere a un método en el que una señal diana indicativa de la presencia de la hebra extendida se obtiene por fusión del ácido nucleico bicatenario extendido, incluyendo un método para medir señales a dos temperaturas diferentes, análisis de curva de fusión, análisis de patrón de fusión y análisis de pico de fusión. Preferentemente, el análisis de fusión es un análisis de curva de fusión.

De acuerdo con una realización, la detección de la presencia de la hebra extendida en la etapa (e) se realiza mediante un análisis de fusión en el que el ácido nucleico bicatenario extendido se funde en un intervalo de temperaturas para proporcionar una señal diana indicativa de la presencia de la hebra extendida.

Como alternativa, la detección de la presencia de la hebra extendida en la etapa (e) se realiza mediante un análisis de hibridación. Preferentemente, la detección de la presencia de la hebra extendida en la etapa (e) se realiza mediante un análisis de hibridación en el que el ácido nucleico bicatenario extendido se funde y el producto resultante se hibrida en un intervalo de temperaturas para proporcionar una señal diana indicativa de la presencia de la hebra extendida.

De acuerdo con una realización, la fusión de la etapa (e) va seguida de hibridación para proporcionar la señal diana indicativa de la presencia de la hebra extendida. En ese caso, la presencia de la hebra extendida se detecta mediante análisis de curva de hibridación.

La curva de fusión o la curva de hibridación se puede obtener mediante tecnologías convencionales, por ejemplo, como se describe en los documentos de Patente de Estados Unidos N.ºs 6.174.670 y 5.789.167, Drobyshev et ál., Gene 188: 45 (1997); Kochinsky y Mirzabekov Human Mutation 19: 343(2002); Livehits et ál., J. Biomol. Structure Dynam. 11: 783 (1994); y Howell et ál., Nature Biotechnology 17: 87 (1999). Por ejemplo, una curva de fusión o curva de hibridación puede consistir en una representación gráfica o presentación de la variación de la señal de salida con el parámetro de rigurosidad de hibridación. La señal de salida se puede representar directamente con respecto al parámetro de hibridación. Por lo general, una curva de fusión o curva de hibridación tendrá la señal de salida, por ejemplo fluorescencia, que indica el grado de estructura del híbrido (es decir, el alcance de la hibridación), representada en el eje Y, y el parámetro de hibridación en el eje X.

Una representación de la primera derivada de la fluorescencia con respecto a la temperatura, es decir, una representación de la tasa de cambio de fluorescencia con respecto a la temperatura ( $dF/dT$  con respecto a T) o ( $-dF/dT$  con respecto a T) proporciona pico de fusión.

La etapa (e) realizada de acuerdo con el análisis de fusión o de hibridación se describirá en detalle con la variación de un sistema de etiquetado como sigue a continuación:

(i) Etiqueta unida al primer fragmento y/o el CTO

De acuerdo con una realización, la señal diana se proporciona mediante al menos una etiqueta unida al primer fragmento y/o el CTO. A medida que el ácido nucleico bicatenario extendido se forma entre el primer fragmento y CTO, cualquiera de la etiqueta en el primer fragmento o en el CTO está presente en el ácido nucleico bicatenario extendido, proporcionando la señal diana en la etapa de fusión.

La etiqueta incluye una etiqueta doble interactiva y una etiqueta individual.

(i-1) Etiqueta doble interactiva

Como un caso representativo del sistema de etiqueta interactiva, el sistema de etiqueta FRET (transferencia de energía de resonancia por fluorescencia) incluye una molécula indicadora fluorescente (molécula dadora) y una molécula de interrupción (molécula aceptora). En la FRET, el dador de energía es fluorescente, pero el aceptor de energía puede ser fluorescente o no fluorescente. En otra forma de sistemas de etiqueta interactiva, el dador de energía no es fluorescente, por ejemplo, un cromóforo, y el aceptor de energía es fluorescente. Además en otra forma de sistemas de etiqueta interactiva, el dador de energía es luminiscente, por ejemplo bioluminiscente, quimioluminiscente, electroquimioluminiscente, y el aceptor es fluorescente. La molécula dadora y la molécula aceptora se pueden describir como una molécula indicadora y una molécula de interrupción en la presente invención, respectivamente. La etiqueta doble interactiva incluye el par de etiquetas que proporciona señal detectable basándose en interrupción mediada por contacto (Salvatore et ál., Nucleic Acids Research, 2002 (30) no.21 e122 y Johansson et ál., J. AM. CHEM. SOC 2002 (124) pp 6950-6956). En la presente invención, el sistema

de etiqueta interactiva incluye cualquiera o todos los casos que inducen cambios en la señal mediante interacción entre al menos dos moléculas (por ejemplo, colorantes).

5 En particular, la señal indicativa de la presencia de la hebra extendida (es decir, la presencia de la secuencia de ácidos nucleicos diana) se genera mediante sistemas de etiqueta interactiva, más preferentemente el sistema de etiqueta FRET (es decir, sistema de etiqueta doble interactiva).

#### Primera Realización (Etiqueta doble interactiva intrahebra)

10 En una primera realización de un sistema de etiqueta doble interactiva, el primer fragmento o el CTO tiene una etiqueta doble interactiva que comprende una molécula indicadora y una molécula de interrupción; en el que la fusión del ácido nucleico bicatenario extendido en la etapa (e) induce cambios de una señal de la etiqueta doble interactiva para proporcionar la señal diana en la etapa (e). La primera realización del sistema de etiqueta doble interactiva se ilustra en la Fig. 5. La primera realización se denomina etiqueta doble interactiva intrahebra.

15 Primera Realización-1 (Etiqueta doble interactiva intrahebra en el CTO)

20 La realización usada a modo de ejemplo se describe con referencia a la Fig. 5. La porción de formación de molde del CTO tiene una molécula indicadora y una molécula de interrupción. El PTO-NV hibridado con la secuencia de ácidos nucleicos diana se digiere para liberar el primer fragmento y el primer fragmento se hibrida con la porción de captura del CTO y se extiende para formar el ácido nucleico bicatenario extendido.

25 Cuando el ácido nucleico bicatenario extendido se forma en la etapa (d), la molécula indicadora y la molécula de interrupción en el CTO se separan conformacionalmente para permitir que la molécula de interrupción interrumpa la señal de la molécula indicadora; en la que cuando el ácido nucleico bicatenario extendido se funde en la etapa (e), la molécula indicadora y la molécula de interrupción son conformacionalmente adyacentes entre sí para permitir que la molécula de interrupción interrumpa la señal de la molécula indicadora, de modo que la señal diana se proporciona para indicar la presencia de la hebra extendida en la etapa (e).

30 La expresión "la molécula indicadora y la molécula de interrupción son conformacionalmente adyacentes" usada en el presente documento se refiere a que la molécula indicadora y la molécula de interrupción son tridimensionalmente adyacentes entre sí mediante una estructura conformacional del primer fragmento o CTO tal como una ruptura de bobina y horquilla aleatoria.

35 La expresión "la molécula indicadora y la molécula de interrupción están conformacionalmente separadas" usada en el presente documento se refiere a que la molécula indicadora y la molécula de interrupción están tridimensionalmente separadas mediante cambio de una estructura conformacional del primer fragmento o CTO después de la formación de una doble hebra.

40 Preferentemente, la señal diana proporcionada en la etapa (e) incluye una curva de fusión, un patrón de fusión o un valor de  $T_m$  que se obtiene midiendo el cambio de la señal fluorescente generada en la etapa (d).

45 De acuerdo con una realización, la molécula indicadora y la molécula de interrupción se pueden situar en cualquier sitio en el CTO, siempre y cuando la señal de la molécula indicadora se interrumpa y no se interrumpa dependiendo de la fusión del ácido nucleico bicatenario extendido.

De acuerdo con una realización, tanto la molécula indicadora como la molécula de interrupción están unidas a la porción de formación de molde o a la porción de captura del CTO.

50 De acuerdo con una realización, la molécula indicadora y la molécula de interrupción se colocan en el extremo en la posición 5' terminal y en el extremo en la posición 3' terminal del CTO.

55 De acuerdo con una realización, una de la molécula indicadora y la molécula de interrupción en el CTO se sitúa en su extremo en la posición 5' terminal o a 1-5 nucleótidos de separación desde su extremo en la posición 5' terminal y la otra se sitúa para interrumpir y no interrumpir la señal de la molécula indicadora dependiendo de la conformación del CTO.

60 De acuerdo con una realización, una de la molécula indicadora y la molécula de interrupción en el CTO se sitúa en su extremo en la posición 3' terminal o a 1-5 nucleótidos de separación desde su extremo en la posición 3' terminal y la otra se sitúa para interrumpir y no interrumpir la señal de la molécula indicadora dependiendo de la conformación del CTO.

65 De acuerdo con una realización, la molécula indicadora y la molécula de interrupción se sitúan a no más de 80 nucleótidos, más preferentemente no más de 60 nucleótidos, aún más preferentemente no más de 30 nucleótidos, aún mucho más preferentemente no más de 25 nucleótidos de separación entre sí. De acuerdo con una realización, la molécula indicadora y la molécula de interrupción se separan en al menos 4 nucleótidos, más preferentemente al

menos 6 nucleótidos, aún más preferentemente al menos 10 nucleótidos, aún mucho más preferentemente al menos 15 nucleótidos.

En la presente invención, se puede formar un híbrido entre el PTO-NV no escindido y el CTO.

5 Cuando la porción de formación de molde del CTO se etiqueta con una etiqueta doble interactiva como se muestra en la Fig. 5, no se induce un cambio de la señal desde la etiqueta en el híbrido entre el PTO-NV no escindido y el CTO. Por lo tanto, el hibridoma proporciona una señal no diana.

10 Cuando la porción de captura del CTO se etiqueta con una etiqueta doble interactiva, el híbrido entre el PTO no escindido y el CTO proporciona una señal no diana en la etapa de fusión. En este caso, la diferencia en los valores de  $T_m$  del ácido nucleico bicatenario extendido y el híbrido permite diferenciar la señal diana del ácido nucleico bicatenario extendido de la señal no diana del híbrido.

15 Primera Realización-2 (Etiqueta doble interactiva intrahebra en el PTO-NV)

La porción de etiquetado en la posición 5' del PTO-NV puede tener una molécula indicadora y una molécula de interrupción. El PTO-NV hibridado con la secuencia de ácidos nucleicos diana se digiere para liberar el primer fragmento que comprende la porción de etiquetado en la posición 5' con la molécula indicadora y la molécula de interrupción. El primer fragmento se hibrida con la porción de captura del CTO.

20 Cuando el ácido nucleico bicatenario extendido se forma en la etapa (d), la molécula indicadora y la molécula de interrupción en el primer fragmento se separan conformacionalmente para permitir que la molécula de interrupción interrumpa la señal de la molécula indicadora; en la que cuando el ácido nucleico bicatenario extendido se funde en la etapa (e), la molécula indicadora y la molécula de interrupción son conformacionalmente adyacentes entre sí para permitir que la molécula de interrupción interrumpa la señal de la molécula indicadora, de modo que la señal diana se proporciona para indicar la presencia de la hebra extendida en la etapa (e).

25 De acuerdo con una realización, la molécula indicadora y la molécula de interrupción se pueden situar en cualquier sitio en el primer fragmento, siempre y cuando la señal de la molécula indicadora se interrumpa y no se interrumpa dependiendo de la fusión del ácido nucleico bicatenario extendido.

30 De acuerdo con una realización, una de la molécula indicadora y la molécula de interrupción en el primer fragmento se sitúa en su extremo en la posición 5' terminal o a 1-5 nucleótidos de separación desde su extremo en la posición 5' terminal y la otra se sitúa para interrumpir y no interrumpir la señal de la molécula indicadora dependiendo de la conformación del primer fragmento.

35 De acuerdo con una realización, la molécula indicadora y la molécula de interrupción se sitúan a no más de 50 nucleótidos, más preferentemente no más de 40 nucleótidos, aún más preferentemente no más de 30 nucleótidos, aún mucho más preferentemente no más de 20 nucleótidos de separación entre sí. De acuerdo con una realización, la molécula indicadora y la molécula de interrupción se separan en al menos 4 nucleótidos, más preferentemente al menos 6 nucleótidos, aún más preferentemente al menos 10 nucleótidos, aún mucho más preferentemente al menos 15 nucleótidos.

40 El híbrido entre el PTO-NV no escindido y el CTO puede proporcionar una señal no diana en la etapa de fusión. En este caso, la diferencia en los valores de  $T_m$  del ácido nucleico bicatenario extendido y el híbrido permite diferenciar la señal diana del ácido nucleico bicatenario extendido de la señal no diana del híbrido.

45 Segunda Realización (Etiqueta doble interactiva interhebra)

50 En la segunda realización del sistema de etiqueta interactiva, el primer fragmento tiene una de una etiqueta doble interactiva que comprende una molécula indicadora y una molécula de interrupción y el CTO tiene la otra de la etiqueta doble interactiva; en el que la fusión del ácido nucleico bicatenario extendido en la etapa (e) induce cambios de una señal de la etiqueta doble interactiva para proporcionar la señal diana en la etapa (e).

55 Por ejemplo, cuando el ácido nucleico bicatenario extendido se forma en la etapa (d), la señal de la molécula indicadora unida al el CTO se interrumpe por la molécula de interrupción unida al PTO-NV. Cuando el ácido nucleico bicatenario extendido se funde en la etapa (e), la molécula indicadora y la molécula de interrupción se separan para permitir que la molécula de interrupción interrumpa la señal de la molécula indicadora, de modo que la señal diana se proporciona para indicar la presencia de la hebra extendida en la etapa (e).

60 En particular, la señal diana proporcionada en la etapa (e) incluye una curva de fusión, un patrón de fusión o un valor de  $T_m$  que se obtiene midiendo el cambio de la señal fluorescente de la etiqueta doble interactiva.

La molécula indicadora y la molécula de interrupción se pueden situar en cualquier sitio del primer fragmento y el CTO, siempre y cuando la señal de la molécula indicadora se interrumpa con la molécula de interrupción en el ácido nucleico bicatenario extendido.

5 De acuerdo con una realización, la molécula indicadora o la molécula de interrupción en el fragmento de PTO-NV se sitúa en el extremo en la posición 5' terminal de la porción de etiquetado en la posición 5'.

De acuerdo con una realización, la molécula indicadora o la molécula de interrupción en el CTO se sitúa en su extremo en la posición 3' terminal.

10 El híbrido entre el PTO no escindido y el CTO puede proporcionar una señal no diana en la etapa de fusión. En este caso, la diferencia en los valores de  $T_m$  del ácido nucleico bicatenario extendido y el híbrido permite diferenciar la señal diana del ácido nucleico bicatenario extendido de la señal no diana del híbrido.

15 La molécula indicadora y la molécula de interrupción útiles en la presente invención pueden incluir cualquier molécula conocida en la técnica. Algunos ejemplos de las mismas son: Cy2™ (506), YO-PRO™-1 (509), YOYO™-1 (509), Calcein (517), FITC (518), FluorX™ (519), Alexa™ (520), Rodamina 110 (520), Oregon Green™ 500 (522), Oregon Green™ 488 (524), RiboGreen™ (525), Rhodamina Green™ (527), Rodamina 123 (529), Magnesium Green™ (531), Calcium Green™ (533), TO-PRO™-1 (533), TOTO1 (533), JOE (548), BODIPY530/550 (550), DiI (565), BODIPY TMR (568), BODIPY558/568 (568), BODIPY564/570 (570), Cy3™ (570), Alexa™ 546 (570), TRITC (572), Magnesium Orange™ (575), Ficoeritrina R&B (575), Rodamina Faloidina (575), Calcium Orange™ (576), Pironina Y (580), Rodamina B (580), TAMRA (582), Rhodamina Red™ (590), Cy3.5™ (596), ROX (608), Calcium Crimson™ (615), Alexa™ 594 (615), Rojo Texas (615), Rojo de Nilo (628), YO-PRO™-3 (631), YOYO™-3 (631), R-Ficocianina (642), C-Ficocianina (648), TO-PRO™-3 (660), TOTO3 (660), DiD DiI(5) (665), Cy5™ (670), Tiadcarbocianina (671), Cy5.5 (694), HEX (556), TET (536), Biosearch Blue (447), CAL Fluor Gold 540 (544), CAL Fluor Orange 560 (559), CAL Fluor Red 590 (591), CAL Fluor Red 610 (610), CAL Fluor Red 635 (637), FAM (520), Fluoresceína (520), Fluoresceína-C3 (520), Pulsar 650 (566), Quasar 570 (667), Quasar 670 (705) y Quasar 705 (610). El número entre paréntesis indica la longitud de onda máxima de emisión en nanómetros. En particular, la molécula indicadora y la molécula de interrupción incluyen JOE, FAM, TAMRA, ROX y un marcador a base de fluoresceína.

Los pares adecuados de molécula indicadora-molécula de interrupción se desvelan en una diversidad de publicaciones como sigue a continuación: Pesce et ál., editores, Fluorescence Spectroscopy (Marcel Dekker, New York, 1971); White et ál., Fluorescence Analysis: A Practical Approach (Marcel Dekker, New York, 1970); Berlman, Handbook of Fluorescence Spectra of Aromatic Molecules, 2ª Edición (Academic Press, New York, 1971); Griffiths, Color AND Constitution of Organic Molecules (Academic Press, New York, 1976); Bishop, editor, Indicators (Pergamon Press, Oxford, 1972); Haugland, Handbook of Fluorescent Probes y Research Chemicals (Molecular Probes, Eugene, 1992); Pringsheim, Fluorescence and Phosphorescence (Interscience Publishers, New York, 1949); Haugland, R. P., Handbook of Fluorescent Probes and Research Chemicals, 6ª Edición (Molecular Probes, Eugene, Oreg., 1996) documentos de Patente de Estados Unidos N.ºs 3.996.345 y 4.351.760.

Es digno de tener en cuenta que una molécula de interrupción negra no fluorescente capaz de interrumpir una fluorescencia de una amplia gama de longitudes de onda o una longitud de onda específica se puede usar en la presente invención. Los ejemplos las mismas son BHQ y DABCYL.

45 En la etiqueta de FRET adoptada para el CTO, la molécula indicadora incluye un dador de FRET y la molécula de interrupción incluye el otro asociado (aceptor) de FRET. Por ejemplo, un colorante de fluoresceína se usa como la molécula indicadora y un colorante de rodamina como la molécula de interrupción.

50 Las etiquetas se pueden unir al CTO o PTO-NV mediante métodos convencionales. En particular, se une al CTO o PTO-NV a través de un espaciador que contiene átomos de carbono (por ejemplo, espaciador de 3 carbonos, espaciador de 6 carbonos o espaciador de 12 carbonos).

(i-2) Etiqueta individual

55 La presente invención también se ejecuta de forma excelente usando sistemas de una etiqueta individual para proporcionar señales que indican la presencia de secuencias de ácidos nucleicos diana.

60 De acuerdo con una realización, el primer fragmento o el CTO tiene una etiqueta individual, y la fusión del ácido nucleico bicatenario extendido en la etapa (e) induce el cambio de una señal de la etiqueta individual para proporcionar la señal diana en la etapa (e).

Primera Realización (Sistema de una etiqueta individual)

65 La porción de formación de molde del CTO puede tener una etiqueta individual fluorescente. El PTO-NV hibridado con la secuencia de ácidos nucleicos diana se digiere para liberar el primer fragmento. El primer fragmento se

5 hibrida con la porción de captura del CTO y se extiende para formar el ácido nucleico bicatenario extendido. Mediante la formación del ácido nucleico bicatenario extendido, la intensidad de la fluorescencia de la etiqueta fluorescente individual llega a aumentar. Cuando el ácido nucleico bicatenario extendido se funde en la etapa (e), la intensidad fluorescente de la etiqueta fluorescente individual llega a disminuir, de modo que la señal diana se proporciona para indicar la presencia de la era extendida en la etapa (e).

10 De acuerdo con una realización, la etiqueta individual se puede situar en cualquier sitio en el CTO, siempre y cuando el nivel de la señal de la etiqueta individual cambie dependiendo de la fusión del ácido nucleico bicatenario extendido.

15 De acuerdo con una realización, la etiqueta individual se une a la porción de formación de molde o a la porción de captura del CTO.

20 Cuando la porción de formación de molde del CTO se etiqueta con una etiqueta individual, no se induce un cambio de la señal desde la etiqueta en el híbrido entre el PTO-NV no escindido y el CTO. Por lo tanto, el híbrido no proporciona una señal no diana.

25 Cuando la porción de captura del CTO se etiqueta con una etiqueta individual, el híbrido entre el PTO-NV no escindido y el CTO proporciona una señal no diana en la etapa de fusión. En este caso, la diferencia en los valores de  $T_m$  del ácido nucleico bicatenario extendido y el híbrido permite diferenciar la señal diana del ácido nucleico bicatenario extendido de la señal no diana del híbrido.

#### Segunda Realización (Sistema de etiqueta individual)

30 La porción de etiquetado en la posición 5' del PTO-NV puede tener una etiqueta fluorescente individual. El PTO-NV hibridado con la secuencia de ácidos nucleicos diana se digiere para liberar el primer fragmento que comprende la porción de etiquetado en la posición 5' con la etiqueta fluorescente individual. Mediante la hibridación, la intensidad de la señal de la etiqueta fluorescente individual en la porción de etiquetado en la posición 5' aumenta. Cuando el ácido nucleico bicatenario extendido secunde en la etapa (e), la intensidad de la señal de la etiqueta fluorescente individual llega a disminuir, de modo que la señal diana se proporciona para indicar la presencia de la hebra extendida en la etapa (e).

35 De acuerdo con una realización, la etiqueta individual se puede situar en cualquier sitio en el primer fragmento, siempre y cuando el nivel de la señal de la etiqueta individual cambie dependiendo de la fusión del ácido nucleico bicatenario extendido.

40 El híbrido entre el PTO-NV no escindido y el CTO puede proporcionar una señal no diana en la etapa de fusión. En este caso, la diferencia en los valores de  $T_m$  del ácido nucleico bicatenario extendido y el híbrido permite diferenciar la señal diana del ácido nucleico bicatenario extendido de la señal no diana del híbrido.

45 La etiqueta individual usada en el presente documento tiene que ser capaz de proporcionar una señal diferente dependiendo de su presencia en una doble hebra o en una sola hebra. La etiqueta individual incluye una etiqueta fluorescente, una etiqueta luminiscente, una etiqueta quimioluminiscente, una etiqueta electroquímica y una etiqueta metálica. Preferentemente, la etiqueta individual incluye una etiqueta fluorescente.

50 Los tipos y sitios de unión preferentes de las etiquetas fluorescentes individuales usadas en la presente invención se desvelan en los documentos de Patente de Estados Unidos N.ºs 7.537.886 y 7.348.141. Preferentemente, la etiqueta fluorescente individual incluye JOE, FAM, TAMRA, ROX y etiqueta a la base de fluoresceína. El resto de nucleótido etiquetado se sitúa preferentemente en el resto de nucleótido interno dentro del oligonucleótido en lugar del extremo en la posición 5' terminal o el extremo en la posición 3' terminal.

La etiqueta fluorescente individual útil en la presente invención se puede describir con referencia a las descripciones para las moléculas indicadoras y de interrupción como se ha indicado anteriormente.

55 En particular, cuando la presente invención en una fase sólida se realiza usando una etiqueta individual, ésta puede utilizar una etiqueta fluorescente general y no requiere una etiqueta fluorescente específica capaz de proporcionar una señal fluorescente con diferentes intensidades dependiendo de su presencia en la doble hebra o en la hebra individual. Se mide la señal diana proporcionada en el sustrato sólido.

60 Cuando se usa el CTO inmovilizado sobre un sustrato sólido, se pueden usar etiquetas químicas (por ejemplo, biotina) o etiquetas enzimáticas (por ejemplo, fosfatasa alcalina, peroxidasa,  $\beta$ -galactosidasa y  $\beta$ -glucosidasa).

65 En el sistema de etiquetado que usa "etiqueta unida al primer fragmento y/o el CTO", las etiquetas se pueden situar en la medida en la que cuando se forma un híbrido entre un PTO-NV no escindido y el CTO, el híbrido no proporciona una señal no diana en la etapa (e). Como alternativa, las etiquetas se pueden situar en la medida en la que cuando se forma un híbrido entre un PTO-NV no escindido y el CTO, el híbrido proporciona una señal no diana

en la etapa (e); en el que el valor de  $T_m$  del ácido nucleico bicatenario extendido es mayor que el del híbrido entre el PTO-NV no escindido y el CTO.

En particular, cuando las etiquetas se sitúan en la medida en la que un híbrido entre un PTO-NV no escindido y el CTO no proporciona una señal no diana, el intervalo que incluye el valor de  $T_m$  del híbrido se puede utilizar para seleccionar el valor de  $T_m$  del ácido nucleico bicatenario extendido para detectar una secuencia de ácidos nucleicos diana.

(ii) Etiqueta incorporada en el ácido nucleico bicatenario extendido

La presente invención puede usar una etiqueta incorporada en el ácido nucleico bicatenario extendido durante la reacción de extensión para proporcionar la señal diana indicativa de la presencia de la hebra extendida.

Aunque el primer fragmento o CTO no tiene etiqueta, una etiqueta incorporada en el ácido nucleico bicatenario extendido durante la reacción de extensión se usa de forma satisfactoria para permitir el etiquetado del ácido nucleico bicatenario extendido.

De acuerdo con una realización, la señal diana se proporciona mediante una etiqueta individual incorporada en el ácido nucleico bicatenario extendido durante la reacción de extensión; en el que la etiqueta individual incorporada se une a un nucleótido incorporado durante la reacción de extensión; en el que la fusión del ácido nucleico bicatenario extendido en la etapa (e) induce el cambio de una señal de la etiqueta individual para proporcionar la señal diana en la etapa (e).

Por ejemplo, el PTO-NV hibridado con la secuencia de ácidos nucleicos diana se digiere para liberar el primer fragmento. El primer fragmento se hibrida con la porción de captura del CTO inmovilizadas sobre un sustrato sólido y extendida en presencia de nucleótidos etiquetados con la etiqueta fluorescente individual para formar el ácido nucleico bicatenario extendido. La señal fluorescente del ácido nucleico bicatenario extendido se puede detectar en aplicación puntual del sustrato sólido con CTO inmovilizado. Cuando el ácido nucleico bicatenario extendido se funde, una hebra que tiene una etiqueta fluorescente se libera y la señal fluorescente ya no se detecta en la aplicación puntual. Por lo tanto, un cambio de señal se puede proporcionar en la aplicación puntual por fusión del ácido nucleico bicatenario extendido. En este sentido, la señal diana se proporciona para indicar la presencia de la hebra extendida en la etapa (e).

La señal diana proporcionada en la etapa (e) incluye una curva de fusión, un patrón de fusión o un valor de  $T_m$  que se obtiene midiendo el cambio de la intensidad fluorescente en la aplicación puntual inmovilizada con CTO.

De acuerdo con una realización, un nucleótido incorporado durante la reacción de extensión es un ddNTP.

De acuerdo con una realización, un nucleótido incorporado durante la reacción de extensión tiene una primera base no natural y el CTO tiene un nucleótido que tiene una segunda base en lo natural con una afinidad de unión específica para la primera base no natural. El nucleótido que tiene la segunda base no natural se sitúa preferentemente en cualquier sitio en la porción de formación de molde del CTO.

La expresión "base no natural" usada en el presente documento se refiere a derivados de bases naturales tales como adenina (A), guanina (G), timina (T), citosina (C) y uracilo (U), que son capaces de formar pares de bases de enlaces de hidrógeno. La expresión "base no natural" usada en el presente documento incluye bases que tienen diferentes patrones de emparejamiento de bases a partir de bases naturales tales como compuestos precursores, como se describe, por ejemplo, en los documentos de Patente de Estados Unidos N.ºs 5.432.272, 5.965.364, 6.001.983, y 6.037.120. El emparejamiento de bases entre bases no naturales implica dos o tres enlaces de hidrógeno como bases naturales. El emparejamiento de bases entre bases no naturales también se forma de una manera específica.

Los ejemplos específicos de bases no naturales incluyen las siguientes bases en combinaciones de pares de bases: iso-C/iso-G, iso-dC/iso-dG, K/X, H/J, y M/N (véase el documento de Patente de Estados Unidos N.º 7.422.850).

Por ejemplo, el primer fragmento se hibrida con el CTO con un nucleótido que tiene una segunda base no natural (por ejemplo, iso-dC) con una afinidad de unión específica para una primera base no natural (por ejemplo, iso-dG). La extensión se realiza en presencia de un nucleótido que tienen la primera base no natural etiquetada con una etiqueta fluorescente individual, que forma el ácido nucleico bicatenario extendido. En la reacción de extensión, el nucleótido que tiene la primera base no natural se incorpora en un sitio opuesto al nucleótido que tiene la segunda base no natural.

La señal fluorescente del ácido nucleico bicatenario extendido se puede detectar en la aplicación puntual de un sustrato sólido con CTO inmovilizado. Cuando el ácido nucleico bicatenario extendido se funde, una hebra que tiene una etiqueta fluorescente se libera y la señal fluorescente ya no se detecta en la aplicación puntual. Por lo tanto, un

cambio de señal se puede proporcionar en la aplicación puntual por fusión del ácido nucleico bicatenario extendido. En este sentido, la señal diana se proporciona para indicar la presencia de la hebra extendida en la etapa (e).

5 Cuando se usa la etiqueta incorporada en el ácido nucleico bicatenario extendido durante la reacción de extensión, la etiqueta no se incorpora en el híbrido entre el PTO-NV no escindido y el CTO porque el híbrido no se extiende. Por lo tanto, el híbrido no proporciona una señal no diana.

10 Los tipos de características de las etiquetas individuales usadas se pueden describir con referencia a descripciones para el sistema de etiquetado usando "la etiqueta unida al primer fragmento y/o el CTO" como se ha indicado anteriormente en el presente documento.

(iii) Etiqueta incorporada en el ácido nucleico bicatenario extendido y etiqueta unida al primer fragmento o el CTO

15 La presente invención puede usar un sistema de etiquetado usando la cooperación de una etiqueta incorporada en el ácido nucleico bicatenario extendido durante la reacción de extensión y una etiqueta unida al primer fragmento y/o el CTO.

20 De acuerdo con una realización, la señal diana desproporcionada por una etiqueta incorporada en el ácido nucleico bicatenario extendido durante la reacción de extensión y una etiqueta unida al primer fragmento y/o el CTO, y la etiqueta incorporada se une a un nucleótido incorporado durante la reacción de extensión; en el que las dos etiquetas son una etiqueta doble interactiva de una molécula indicadora y que una molécula de interrupción; en el que la fusión del ácido nucleico bicatenario extendido en la etapa (e) induce cambios de una señal de la etiqueta doble interactiva para proporcionar la señal diana en la etapa (e).

25 En particular, el nucleótido incorporado durante la reacción de extensión tiene una primera base no natural y el CTO tiene un nucleótido que tiene una segunda base no natural con una afinidad de unión específica para la primera base no natural.

30 Por ejemplo, el primer fragmento se hibrida con el CTO que comprende una molécula indicadora o de interrupción y un nucleótido que tiene una segunda base no natural (por ejemplo, iso-dC) que tiene una afinidad de unión específica para una primera base no natural (por ejemplo, iso-dG). La extensión se realiza en presencia de un nucleótido que tiene la primera base no natural etiquetada con una molécula de interrupción o indicadora, que forma el ácido nucleico bicatenario extendido en el que la señal de la molécula indicadora se interrumpe con la molécula de interrupción. En la reacción de extensión, el nucleótido que tiene la primera base no natural se incorpora en un sitio opuesto al nucleótido que tiene la segunda base no natural.

35 Cuando el ácido nucleico bicatenario extendido se funde en la etapa (e), la molécula indicadora y la molécula de interrupción se separan para permitir que la molécula de interrupción interrumpa la señal de la molécula indicadora, de modo que la señal diana se proporciona para indicar la presencia de la hebra extendida en la etapa (e).

40 En particular, la señal diana proporcionada en la etapa (e) incluye una curva de fusión, un patrón de fusión o un valor de  $T_m$  que se obtiene midiendo el cambio de la señal de la etiqueta doble interactiva.

45 El sitio de la etiqueta en el CTO y el sitio de incorporación de la etiqueta incorporada se determinan en la medida en la que las dos etiquetas actúan como una etiqueta doble interactiva para inducir un cambio de señal en la etapa de fusión.

50 En particular, la porción de formación de molde del CTO tiene una molécula indicadora o de interrupción y un nucleótido que tiene una segunda base no natural. La reacción de extensión en la etapa (d) se realiza en presencia de un nucleótido que tiene una molécula de interrupción o indicadora y una primera base no natural con una afinidad de unión específica para la segunda base no natural en el CTO. Las dos bases no naturales en el ácido nucleico bicatenario extendido en la etapa (d) forman un par de bases para interrumpir una señal de la molécula indicadora con la molécula de interrupción y para inducir el cambio de una señal, de modo que se proporciona la señal diana. Como alternativa, el primer fragmento tiene una molecular indicadora o de interrupción y la porción de formación de molde del CTO tiene un nucleótido que tiene una segunda base no natural. La reacción de extensión en la etapa (d) se realiza en presencia de un nucleótido que tiene una molécula de interrupción o indicadora y una primera base no natural con una afinidad de unión específica para la segunda base en lo natural en el CTO. Las dos bases no naturales en el ácido nucleico bicatenario extendido en la etapa (d) forman un par de bases para inducir el cambio de una señal de la molécula indicadora mediante interrupción, de modo que se proporciona la señal diana.

60 Como otro ejemplo, el primer fragmento que tiene una molécula indicadora o de interrupción se hibrida con el CTO que comprende un nucleótido que tiene una segunda base no natural (por ejemplo, iso-dC) que tiene una afinidad de unión específica para una primera base no natural (por ejemplo, iso-dG). La extensión se realiza en presencia de un nucleótido que tiene la primera base no natural etiquetada con una molécula de interrupción o indicadora, que forma el ácido nucleico bicatenario extendido en el que la señal de la molécula indicadora se interrumpe con la molécula de

65

interrupción. En la reacción de extensión, el nucleótido que tiene la primera base no natural se incorpora en un sitio opuesto al nucleótido que tiene la segunda base no natural.

5 Cuando el ácido nucleico bicatenario extendido se forma en la etapa (d), la molécula indicadora y la molécula de interrupción se separan conformacionalmente para permitir que la molécula de interrupción interrumpa la señal de la molécula indicadora; en la que cuando el ácido nucleico bicatenario extendido se funde en la etapa (e), la molécula indicadora y la molécula de interrupción son conformacionalmente adyacentes entre sí para permitir que la molécula de interrupción interrumpa la señal de la molécula indicadora, de modo que la señal diana se proporciona para indicar la presencia de la hebra extendida en la etapa (e).

10 En particular, la señal diana proporcionada en la etapa (e) incluye una curva de fusión, un patrón de fusión o un valor de  $T_m$  que se obtiene midiendo el cambio de la señal de la etiqueta doble interactiva.

15 El sitio de la etiqueta en el PTO-NV y el sitio de incorporación de la etiqueta incorporada se determinan en la medida en la que las dos etiquetas actúan como una etiqueta doble interactiva para inducir un cambio de señal en la etapa de fusión.

20 Cuando la etiqueta incorporada en el ácido nucleico bicatenario extendido se usa durante la reacción de extensión, la etiqueta no se incorpora en el híbrido entre el PTO-NV no escindido y el CTO porque el híbrido no se extiende. Por lo tanto, el híbrido no proporciona una señal no diana en la etapa de fusión.

#### (iv) Etiqueta de intercalado

25 La presente invención puede usar una etiqueta de intercalado para proporcionar la señal diana indicativa de la presencia del ácido nucleico bicatenario extendido. La etiqueta de intercalado es más útil en una reacción en fase sólida que usa los CTO inmovilizados porque las moléculas de ácido nucleico bicatenario presentes en las muestras pueden generar señales.

30 Los colorantes de intercalado usados a modo de ejemplo útiles en la presente invención incluyen Verde SYBR™ I, PO-PRO™-1, BOPRO™-1, SYTO™43, SYTO™44, SYTO™45, SYTOX™Blue, POPO™-1, POPO™-3, BOBO™-1, BOBO™-3, LO-PRO™-1, JO-PRO™-1, YO-PRO™1, TO-PRO™1, SYTO™11, SYTO™13, SYTO™15, SYTO™16, SYTO™20, SYTO™23, TOTO™-3, YOYO™3, GelStar™ y naranja de tiazol. Los colorantes de intercalado se intercalan de forma específica en moléculas de ácido nucleico bicatenario para generar señales.

35 En cierta realización, el primer fragmento se hibrida con la porción de captura del CTO inmovilizado sobre un sustrato sólido. La extensión se realiza en presencia de un colorante de intercalado (por ejemplo, Verde SYBR™) y produce el ácido nucleico bicatenario extendido con colorantes de intercalado. La señal fluorescente del ácido nucleico bicatenario extendido en la aplicación puntual del sustrato sólido con el CTO inmovilizado se puede detectar usando colorantes fluorescentes de intercalado. Cuando el ácido nucleico bicatenario extendido se funde, los colorantes fluorescentes de intercalado se liberan y la señal fluorescente ya no se detecta en la aplicación puntual. En este sentido, la señal diana se proporciona para indicar la presencia del ácido nucleico bicatenario extendido en la etapa (e).

45 El híbrido entre el PTO-NV no escindido y el CTO proporciona una señal no diana en la etapa de fusión. En este caso, la diferencia en los valores de  $T_m$  del ácido nucleico bicatenario extendido y el híbrido permite diferenciar la señal diana del ácido nucleico bicatenario extendido de la señal no diana del híbrido.

50 En particular, la señal diana proporcionada en la etapa (e) incluye una curva de fusión, un patrón de fusión o un valor de  $T_m$  que se obtiene midiendo el cambio de la señal fluorescente generada en la etapa (d).

#### Detección de Ácido Nucleico Bicatenario Extendido a una Temperatura Determinada Previamente

55 De acuerdo con una realización, la detección en la etapa (e) se realiza de acuerdo con el ensayo de PTOCE que comprende detección a una temperatura determinada previamente usando señales del ácido nucleico bicatenario extendido entre la hebra extendida y el CTO (véase el documento WO 2012/096523).

60 De acuerdo con una realización, la hebra extendida del primer fragmento y el CTO forman un ácido nucleico bicatenario extendido en la etapa (d); en el que el ácido nucleico bicatenario extendido tiene un valor de  $T_m$  ajustable por (i) una secuencia y/o longitud del primer fragmento, (ii) una secuencia y/o longitud del CTO o (iii) la secuencia y/o longitud del primer fragmento y la secuencia y/o longitud del CTO; en el que el ácido nucleico bicatenario extendido proporciona una señal diana por (i) al menos una etiqueta unida al primer fragmento y/o CTO, (ii) una etiqueta incorporada en el ácido nucleico bicatenario extendido durante la reacción de extensión, (iii) al menos una etiqueta unida al primer fragmento y/o CTO y una etiqueta incorporada en el ácido nucleico bicatenario extendido durante la reacción de extensión o (iv) etiqueta de intercalado; y en el que la presencia de la hebra extendida se detecta por medición de la señal diana del ácido nucleico bicatenario extendido a una temperatura determinada previamente suficiente para mantener una doble hebra del ácido nucleico bicatenario extendido.

El ácido nucleico bicatenario extendido puede proporcionar *per se* una señal capaz de diferenciar la formación de la no formación del ácido nucleico bicatenario extendido y la señal se detecta a una temperatura determinada previamente de modo que el ácido nucleico bicatenario extendido mantiene su forma de doble hebra, de modo que se determina la presencia de una secuencia de ácidos nucleicos diana.

5 La presente invención es para medir una señal diana en asociación con la formación del ácido nucleico bicatenario extendido, para detección de la presencia de la secuencia de ácidos nucleicos diana.

10 En la presente invención, el ácido nucleico bicatenario extendido tiene una etiqueta de modo que el ácido nucleico bicatenario extendido proporciona una señal diana.

El sistema de etiqueta usado para detección del ácido nucleico bicatenario extendido por análisis de fusión o hibridación puede proporcionar la señal diana en el presente método.

15 El principio de trabajo que suya sea una señal diana del ácido nucleico bicatenario extendido es la que sigue a continuación: (i) la extensión del primer fragmento induce el cambio de una señal desde una etiqueta para proporcionar la señal diana; o (ii) la hibridación del primer fragmento y el CTO induce el cambio de una señal desde una etiqueta para proporcionar la señal diana y el ácido nucleico bicatenario extendido mantiene la señal diana.

20 Por ejemplo, cuando se usan los CTO inmovilizados, la presente invención detecta una pluralidad de secuencias de ácidos nucleicos diana de una manera mucho más eficaz. La porción de formación de molde del CTO inmovilizado tiene una molécula indicadora y una molécula de interrupción. La molécula indicadora y la molécula de interrupción son conformacionalmente adyacentes entre sí para permitir que la molécula de interrupción interrumpa una señal de la molécula indicadora. Cuando el primer fragmento se hibrida con la porción de captura del CTO, la molécula de interrupción interrumpe la señal de la molécula indicadora. Mediante la formación del ácido nucleico bicatenario extendido, la molécula indicadora y la molécula de interrupción se separan conformacionalmente para permitir que la molécula de interrupción interrumpa la señal de la molécula indicadora. La señal diana se proporciona en la etapa de extensión.

30 En cierta realización, la porción de etiquetado en la posición 5' del PTO-NV tiene una molécula indicadora y una molécula de interrupción. La molécula indicadora y la molécula de interrupción son conformacionalmente adyacentes entre sí para permitir que la molécula de interrupción para interrumpir una señal de la molécula indicadora. El PTO-NV hibridado con la secuencia de ácidos nucleicos diana se digiere para liberar el primer fragmento que comprende la porción de etiquetado en la posición 5' con la molécula indicadora y la molécula de interrupción, y el primer fragmento se hibrida con la porción de captura del CTO. Mediante la hibridación, la molécula indicadora y la molécula de interrupción se separan conformacionalmente para permitir que la molécula de interrupción interrumpa la señal de la molécula indicadora. La señal diana se proporciona en la etapa de hibridación de fragmento y el ácido nucleico bicatenario extendido mantiene la señal diana.

40 En el caso en el que la porción de etiquetado en la posición 5' del PTO-NV tenga una molécula indicadora y una molécula de interrupción, el híbrido entre el PTO no escindido y el CTO proporciona una señal no diana y es necesario disociar el híbrido para retirar la señal no diana. Por lo tanto, la temperatura para medir la señal diana se determina para disociar el híbrido. De acuerdo con una realización, la temperatura se determina adicionalmente considerando el valor de  $T_m$  del híbrido.

45 De acuerdo con una realización, el ácido nucleico bicatenario extendido se puede detectar a temperaturas a las que el dividido está parcialmente disociado. De acuerdo con una realización, el ácido nucleico bicatenario extendido se puede detectar a temperaturas en las que el individuo está lo suficientemente disociado como para retirar la señal no diana.

50 De acuerdo con una realización, la temperatura determinada previamente es superior al valor de  $T_m$  del híbrido menos 10 °C, preferentemente, superior al valor de  $T_m$  del híbrido menos 5 °C, más preferentemente, es superior al valor de  $T_m$  del híbrido y aún más preferentemente, es superior al valor de  $T_m$  del híbrido más 5 °C.

#### 55 Detección de Uso de Oligonucleótido de Señalización

De acuerdo con una realización, la hebra extendida del primer fragmento se puede detectar usando un oligonucleótido de señalización (SO) como se desvela en el documento PCT/KR2012/005281.

60 El SO a hibridar con la hebra extendida comprende una secuencia complementaria a la hebra extendida. De acuerdo con una realización, el SO comprende una secuencia complementaria a la secuencia extendida.

De acuerdo con una realización, al menos una porción del SO comprende una secuencia complementaria a la secuencia extendida. La porción del SO que comprende una secuencia complementaria a la secuencia extendida tiene una longitud de al menos uno, dos, tres, cuatro, cinco o diez nucleótidos.

65

5 Cuando una porción del SO se diseña para que comprenda una secuencia complementaria a una porción de la secuencia extendida recién sintetizada, el valor de  $T_m$  del producto de hibridación del SO y la hebra extendida llega a ser diferente del producto de hibridación del SO y el PTO-NV no digerido. La diferencia en los valores de  $T_m$  asegura la diferenciación de señales de los dos productos de hibridación resultantes. Por ejemplo, las señales no diana se pueden excluir en una detección en tiempo real ajustando la temperatura para la detección de los valores de  $T_m$  en consideración, o en un análisis de curva de fusión mediante picos de fusión.

10 El SO puede comprender a través de toda su secuencia una secuencia complementaria a la secuencia extendida. Como alternativa, el SO puede comprender una porción que tiene una secuencia complementaria a la secuencia extendida. Por ejemplo, una porción del SO puede comprender una secuencia complementaria a la secuencia extendida y la otra porción puede comprender una secuencia complementaria al fragmento. En particular, el SO comprende a través de toda su secuencia una secuencia complementaria a la secuencia extendida.

15 El SO puede tener cualquier longitud, por ejemplo, 5-100 nucleótidos, 5-80 nucleótidos, 5-60 nucleótidos, 5-40 nucleótidos, 5-20 nucleótidos, 5-10 nucleótidos, 10-100 nucleótidos, 10-80 nucleótidos, 10-60 nucleótidos, 10-40 nucleótidos, 10-30 nucleótidos, 10-20 nucleótidos, 15-100 nucleótidos, 15-80 nucleótidos, 15-60 nucleótidos, 15-40 nucleótidos, 15-30 nucleótidos, 15-20 nucleótidos, 20-100 nucleótidos, 20-80 nucleótidos, 20-60 nucleótidos, 20-40 nucleótidos o 20-30 nucleótidos.

20 El SO puede tener una estructura de horquilla.

El extremo en la posición 3' terminal del SO serología para prohibir su extensión. Como alternativa, el SO que tiene un extremo 3'-OH no bloqueado se puede extender.

25 De acuerdo con una realización, en la que la hebra extendida del primer fragmento se detecta usando un oligonucleótido de señalización (SO); en la que el SO comprende una secuencia complementaria a la hebra extendida y al menos una etiqueta; el SO proporciona una señal detectable por asociación con o disociación de la hebra extendida.

30 La expresión "asociación con la disociación de la hebra extendida" tiene el mismo significado que la expresión "hibridación con o desnaturalización de la hebra extendida".

35 De acuerdo con una realización, la señal detectable indicativa de la presencia de la secuencia de ácidos nucleicos diana se proporciona mediante (i) la etiqueta unida al SO, (ii) una combinación de la etiqueta unida al SO y una etiqueta unida al fragmento del PTO-NV, (iii) una combinación de la etiqueta unida al SO y una etiqueta a incorporar en la hebra extendida durante la reacción de extensión de la etapa (d), o (iv) una combinación de la etiqueta unida al SO y un colorante de intercalado.

40 En resumen, los sistemas de etiquetado útiles en la presente invención se describirán como sigue a continuación:

(i) Etiqueta individual unida al SO

45 La presente invención puede proporcionar una señal para la formación de la hebra extendida que indica la presencia de la variación de nucleótido diana usando SO con una etiqueta individual. De acuerdo con una realización, el SO se etiqueta con una etiqueta individual y la hibridación entre el SO y la hebra extendida en la etapa (e) induce el cambio en la señal de la etiqueta individual para proporcionar la señal detectable.

50 En una realización, la etiqueta individual usada en el presente documento tiene que ser capaz de proporcionar una señal diferente dependiendo de su presencia en una doble hebra o una sola hebra.

(ii) Etiqueta doble interactiva intrahebra unida a SO

55 De acuerdo con una realización, el SO se etiqueta con una etiqueta doble interactiva que comprende una molécula indicadora y una molécula de interrupción y la hibridación entre el SO y la hebra extendida en la etapa (e) induce el cambio en la señal de la etiqueta doble interactiva para proporcionar la señal detectable (véase la Fig. 6). Antes de la hibridación del SO, la molécula indicadora y la molécula de interrupción en el SO son conformacionalmente adyacentes entre sí para permitir que la molécula de interrupción interrumpa la señal de la molécula indicadora. Después de la hibridación, la molécula indicadora y la molécula de interrupción en el SO se separan conformacionalmente para permitir que la molécula de interrupción interrumpa la señal de la molécula indicadora, produciendo cambios en las señales de la etiqueta doble interactiva.

60 De acuerdo con una realización de la presente invención que usa el SO con una etiqueta doble interactiva, el primer fragmento liberado del PTO-NV hibridado con la secuencia de ácidos nucleicos diana se hibrida con la porción de captura del CTO y se extiende para formar la hebra extendida. Después de la hibridación de la hebra extendida con el SO, la molécula indicadora y la molécula de interrupción en el SO se separan conformacionalmente para permitir que la molécula de interrupción interrumpa la señal de la molécula indicadora, dando lugar a cambios en las señales

de la etiqueta doble interactiva (por ejemplo, aumento de la señal de las moléculas indicadoras). La molécula indicadora y la molécula de interrupción en el SO, no implicadas en la hibridación, son conformacionalmente adyacentes entre sí para permitir que la molécula de interrupción interrumpa la señal de la molécula indicadora.

5 De acuerdo con una realización, la molécula indicadora y la molécula de interrupción se sitúan en el extremo en la posición 5' terminal (o extremo en la posición 3' terminal) y en el extremo en la posición 3' terminal (o extremo en la posición 5' terminal) del SO. De acuerdo con una realización, una de la molécula indicadora y la molécula de interrupción en el SO se sitúa en su extremo en la posición 5' terminal o a 1-5 nucleótidos de separación desde su extremo en la posición 5' terminal y la otra se sitúa para interrumpir y no interrumpir la señal de la molécula indicadora dependiendo de la conformación del SO.

10 De acuerdo con una realización, una de la molécula indicadora y la molécula de interrupción en el SO se sitúa en su extremo en la posición 3' terminal o a 1-5 nucleótidos de separación desde su extremo en la posición 3' terminal y la otra se sitúa para interrumpir y no interrumpir la señal de la molécula indicadora dependiendo de la conformación del SO.

(iii) Etiqueta doble interactiva intrahebra

20 En la realización que usa la etiqueta doble interactiva intrahebra, la hebra extendida tiene una de una etiqueta doble interactiva que comprende una molécula indicadora y una molécula de interrupción y el SO tiene la otra de la etiqueta doble interactiva.

La realización que usa la etiqueta doble interactiva intrahebra se puede realizar de acuerdo con las siguientes tres formas:

25 De acuerdo con la primera forma, el SO comprende una etiqueta entre una molécula indicadora y una molécula de interrupción de una etiqueta doble interactiva, el fragmento del PTO-NV comprende la otra etiqueta entre la molécula indicadora y la molécula de interrupción; la hebra extendida comprende la etiqueta originada a partir del fragmento del PTO-NV, y en la que la hibridación entre el SO y la hebra extendida induce el cambio en la señal de la etiqueta doble interactiva para proporcionar la señal detectable.

Una etiqueta unida al SO puede ser cualquiera de una molécula indicadora o una molécula de interrupción, y una etiqueta para el fragmento puede ser cualquiera de una molécula de interrupción o una molécula indicadora.

35 El sitio de etiquetado en el PTO-NV se determina teniendo en cuenta su sitio de escisión, de modo que el fragmento de PTO-NV puede tener la etiqueta.

40 La etiqueta se puede unir a cualquier sitio (por ejemplo, la porción de etiquetado del PTO-NV) en el fragmento de PTO-NV, siempre y cuando interactúe con la etiqueta para el SO después de hibridación con el SO para inducir un cambio en las señales. La etiqueta se puede unir a cualquier sitio (por ejemplo, el extremo en la posición 5' terminal del SO) en el SO, siempre con interactúe con la etiqueta en el fragmento de PTO-NV después de hibridación con el fragmento de PTO-NV para inducir un cambio en las señales.

45 De acuerdo con la segunda forma, el SO comprende una etiqueta entre una molécula indicadora y una molécula de interrupción de una etiqueta doble interactiva, y la porción de formación de molde del CTO comprende un nucleótido que tiene una primera base no natural; en el que la reacción de extensión en la etapa (d) se realiza en presencia de un nucleótido que tiene tanto una segunda base no natural con una afinidad de unión específica para la primera base no natural como la otra entre la molécula indicadora y la molécula de interrupción, incorporando de ese modo la etiqueta en la hebra extendida; en el que la hibridación entre el SO y la hebra extendida induce el cambio en la señal de la etiqueta doble interactiva para proporcionar la señal detectable.

La etiqueta incorporada durante la extensión se une preferentemente a un nucleótido, más preferentemente a un nucleósido trifosfato. Preferentemente, la etiqueta se une a una base de un nucleósido trifosfato.

55 El fragmento se hibrida con el CTO con un nucleótido que tiene una base no natural (por ejemplo, iso-dC) con una afinidad de unión específica para una base no natural (por ejemplo, iso-dG). La extensión se realiza en presencia de un nucleótido que tienen la iso-dG etiquetada con una molécula de interrupción para formar la hebra extendida. En la reacción de extensión, el nucleótido que tiene iso-dG con una molécula de interrupción se incorpora en un sitio opuesta nucleótido que tiene iso-dC. Después de la hibridación de la hebra extendida que contiene la molécula de interrupción-iso-dG con el SO etiquetado con una molécula indicadora, la molécula de interrupción en la hebra extendida interrumpe la señal que será molécula indicadora en el SO para inducir cambios en la señal, proporcionando la señal detectable.

60 Una de la etiqueta doble interactiva se une al SO y la otra se incorpora en la hebra extendida a partir de una solución de reacción durante la reacción de extensión.

65

Una etiqueta unida al SO puede ser cualquiera de una molécula indicadora o una molécula de interrupción, y una etiqueta incorporada en la hebra extendida puede ser cualquiera de una molécula de interrupción o una molécula indicadora.

5 La etiqueta incorporada en la hebra extendida se puede unir a cualquier sitio en la hebra extendida (por ejemplo, el extremo en la posición 3' terminal de la hebra extendida), siempre con interactúe con la etiqueta para el SO después de hibridación con el SO para inducir un cambio de las señales. La etiqueta se puede unir a cualquier sitio (por ejemplo, el extremo en la posición 5' terminal del SO) en el SO, siempre con interactúe con la etiqueta incorporada en la hebra extendida después de hibridación con la hebra extendida para inducir un cambio en las señales.

10 De acuerdo con la tercera forma, el SO comprende una etiqueta entre una molécula indicadora y una molécula de interrupción de una etiqueta doble interactiva, y la reacción de extensión en la etapa (d) se realiza en presencia de un nucleótido que tiene el otro entre la molécula indicadora y la molécula de interrupción, incorporando de ese modo la etiqueta en la hebra extendida; en el que la hibridación entre el SO y la hebra extendida induce el cambio en la señal de la etiqueta doble interactiva para proporcionar la señal detectable.

15 Una etiqueta unida al SO puede ser cualquiera de una molécula indicadora o una molécula de interrupción (preferentemente molécula indicadora), y una etiqueta incorporada en la hebra extendida puede ser cualquiera de una molécula de interrupción o una molécula indicadora (preferentemente una molécula de interrupción).

20 (iv) Etiqueta doble interactiva usando dos SO

25 En la realización de la etiqueta doble interactiva que usa dos SO, el método de la presente invención usa un SO adicional que comprende una secuencia complementaria a la hebra extendida, los dos SO se hibridan con la hebra extendida de una forma adyacente, cada uno de los dos SO comprende una etiqueta entre una molécula indicadora y una molécula de interrupción de una etiqueta doble interactiva; y la hibridación entre los dos SO y la hebra extendida induce el cambio en la señal de la etiqueta doble interactiva para proporcionar la señal detectable.

30 En particular, al menos uno de los dos SO comprende una porción hibridada a una secuencia recién extendida en la reacción de extensión.

35 El principio que subyace al rendimiento de la realización de la etiqueta doble interactiva que usa dos SO es el que sigue a continuación: el primer fragmento liberado del PTO-NV hibridado con la secuencia de ácidos nucleicos diana que tiene la variación de nucleótido diana se hibrida con la porción de captura del CTO extiende para formar la hebra extendida. A continuación, los dos SO se hibridan con la hebra extendida. En la hibridación, dado que los dos SO se hibridan de forma adyacente con la hebra extendida, la molécula indicadora y la molécula de interrupción en los dos SO son adyacentes entre sí para permitir que la molécula de interrupción interrumpa la señal de la molécula indicadora, dando como resultado un cambio de las señales de la etiqueta doble interactiva (por ejemplo, aumento de la señal de las moléculas indicadoras). La molécula indicadora y la molécula de interrupción en los dos SO no implicados en la hibridación se separan entre sí para generar una señal de la molécula indicadora.

40 De acuerdo con una realización, los dos SO se pueden hibridar con cualquier sitio de la hebra extendida siempre y cuando su hibridación con la hebra extendida permita que la molécula de interrupción interrumpa la señal de la molécula indicadora. Preferentemente, los dos SO se sitúan de una forma inmediatamente adyacente o a 1-5 nucleótidos de separación entre sí.

45 De acuerdo con una realización, cuando los dos SO se pueden hibridar de forma adyacente con la hebra extendida, la molécula indicadora y la molécula de interrupción se pueden unir a cualquier sitio de los dos SO siempre y cuando la molécula de interrupción interrumpa la señal de la molécula indicadora. Por ejemplo, la molécula indicadora o la molécula de interrupción se une al extremo en la posición 5' terminal de un SO o a 1-5 nucleótidos de separación desde su extremo en la posición 5' terminal, y la molécula de interrupción o la molécula indicadora al extremo en la posición 3' terminal del otro SO o a 1-5 nucleótidos de separación desde su extremo en la posición 3' terminal.

50 (v) Etiqueta de FRET usando colorantes de intercalado

55 De acuerdo con la presente invención, una señalización de FRET (transferencia de energía por resonancia de fluorescencia) se hace práctica cuando se usan colorantes de intercalado.

60 De acuerdo con una realización, el SO comprende un aceptor de un FRET y la hibridación en la etapa (e) se realiza previamente en presencia de un colorante de intercalado; en la que la hibridación entre el SO y la hebra extendida induce el cambio en la señal del aceptor del SO para proporcionar la señal detectable.

65 El principio que subyace al rendimiento de la realización de la etiqueta de FRET que usaba colorantes de intercalado es el que sigue a continuación: el primer fragmento liberado del PTO-NV hibridado con la secuencia de ácidos nucleicos diana que tiene la variación de nucleótido diana se hibrida con la porción de captura del CTO y se extiende para formar la hebra extendida. A continuación, el SO etiquetado con el aceptor se hibrida con la hebra extendida

para formar una molécula de ácido nucleico bicatenario y a continuación los colorantes de intercalado se unen a la molécula de ácido nucleico bicatenario. La transferencia energía se produce desde los colorantes de intercalado que sirven como una molécula dadora para el aceptor mediante iluminación a la excitación del dador e induce el cambio en la señal del aceptor para proporcionar la señal detectable.

5 De acuerdo con una realización, el aceptor unido al SO incluye diversas etiquetas fluorescentes individuales que se han descrito anteriormente, pero sin limitación.

10 El SO útil en la presente invención incluye cualquier sonda capaz de proporcionar señores dependientes de la hibridación, por ejemplo, Molecular beacon™ (documento de Pat. de Estados Unidos N.º 5.925.517), Hybeacons™ (D. J. French, et ál., Molecular and Cellular Probes (2001) 13, 363-374 y documento de Pat. de Estados Unidos N.º 7.348.141), Sonda autointerrumpida, con doble etiquetado (documento de Pat. de Estados Unidos N.º 5.876.930), LUX™ (I. A. Nazarenko, et al. Nucleic Acids Res 2002, 30: 2089-2095. y documento de Pat. de Estados Unidos N.º 7.537.886) y Sonda de hibridación (Bernard PS, et ál., Clin Chem 2000, 46, 147-148 y Deepti Parashar et ál., Indian J Med Res 124, revisar el artículo de octubre de 2006 385-398).

De acuerdo con una realización, la detección usando SO se puede realizar de una forma en tiempo real usando etiquetas que proporcionan señales detectables de una forma en tiempo real.

20 Como alternativa, la detección usando SO se puede realizar mediante un análisis de fusión o análisis de hibridación porque las etiquetas usadas en la presente invención son capaces de proporcionar señores detectables durante la fusión del producto resultante de hibridación o fusión y la hibridación del producto resultante de hibridación.

25 De acuerdo con una realización, la hebra extendida se puede amplificar adicionalmente usando un cebador que forme un par de cebadores con el fragmento de PTO-NV.

De acuerdo con una realización, el SO se bloquea en su extremo en la posición 3' terminal para prohibir su extensión.

### 30 DetECCIÓN USANDO OLIGONUCLEÓTIPO DE HIBRIDACIÓN

De acuerdo con una realización, la hebra extendida del primer fragmento se detecta usando un HO (oligonucleótido de hibridación); en la que el HO comprende una secuencia de nucleótidos de hibridación complementaria al CTO y al menos una etiqueta; en el que la extensión del primer fragmento induce la escisión del HO por una enzima que tiene una actividad de 5' nucleasa para generar una señal detectable de la etiqueta.

De acuerdo con una realización, the HO se sitúa cadena abajo del primer fragmento en el CTO.

40 De acuerdo con una realización, el HO comprende una secuencia de nucleótidos de hibridación complementaria a la porción de formación de molde del CTO.

De acuerdo con una realización, la ácido nucleico polimerasa dependiente de molde usada para la extensión del fragmento tiene una actividad de 5' nucleasa.

45 La longitud del HO puede variar ampliamente. Por ejemplo, el HO tiene una longitud de 5-100 nucleótidos, 5-80 nucleótidos, 5-60 nucleótidos, 5-40 nucleótidos, 5-20 nucleótidos, 5-10 nucleótidos, 10-100 nucleótidos, 10-80 nucleótidos, 10-60 nucleótidos, 10-40 nucleótidos, 10-30 nucleótidos, 10-20 nucleótidos, 15-100 nucleótidos, 15-80 nucleótidos, 15-60 nucleótidos, 15-40 nucleótidos, 15-30 nucleótidos, 15-20 nucleótidos, 20-100 nucleótidos, 20-80 nucleótidos, 20-60 nucleótidos, 20-40 nucleótidos o 20-30 nucleótidos.

50 En una realización de la presente invención, el HO se bloquea en su extremo en la posición 3' terminal para prohibir su extensión.

En resumen, los sistemas de etiquetado útiles en la presente invención se describirán como sigue a continuación:

55 (i) Etiqueta individual unida al HO

La presente invención puede proporcionar una señal para la formación de la hebra extendida lo que indica la presencia de la variación de nucleótido diana usando HO con una etiqueta individual.

60 En una realización, la etiqueta individual usada en el presente documento tiene que ser capaz de proporcionar una señal diferente dependiendo de su presencia en una doble hebra o en una sola hebra (por ejemplo, el HO y el fragmento de HO).

65 De acuerdo con una realización, es necesario detectar la señal a una temperatura que permita la hibridación entre el HO y el CTO.

(ii) Etiqueta doble interactiva unida al HO

De acuerdo con una realización, la señal detectable es proporcionada por una etiqueta doble interactiva unida al HO.

5 Como se ilustra en la Fig. 7, el primer fragmento liberado del PTO-NV se hibrida con la porción de captura del CTO y el HO etiquetado con una etiqueta doble interactiva que comprende una molécula indicadora y una molécula de interrupción se hibrida con la porción de formación de molde del CTO. La extensión del primer fragmento induce la escisión del HO para separar la molécula indicadora de la molécula de interrupción, proporcionando de ese modo una señal que indica la presencia de la hebra extendida.

10 En tal realización, cuando los nucleótidos unidos a etiqueta doble son relativamente adyacentes entre sí, los cambios de la señal entre la escisión del HO antes y después se pueden utilizar para detección de señal.

15 Cuando los nucleótidos unidos a etiqueta doble son relativamente distantes entre sí, la hibridación entre el HO y el CTO induce una separación conformacional de la etiqueta doble interactiva para interrumpir la señal de la molécula indicadora incluso sin escisión de HO, generando de ese modo un cambio de señal. En este caso, la señal de un fragmento escindido del HO se puede detectar a temperaturas más elevadas (por ejemplo, 95 °C) para permitir la prevención de la hibridación entre el HO y el CTO.

20 De acuerdo con una realización, la molécula indicadora y la molécula de interrupción se pueden situar en cualquier sitio en el HO, siempre y cuando el HO escindido y el HO no escindido puedan proporcionar señales de diferenciación.

25 En cierta realización, cada una de la molécula indicadora y la molécula de interrupción están situadas a ambos extremos del HO.

(iii) Etiqueta doble interactiva unida al HO y al CTO

30 De acuerdo con una realización, la señal detectable es proporcionada por una de una etiqueta doble interactiva que comprende una molécula indicadora y una molécula de interrupción unida al HO y la otra unida al CTO.

35 En cierta realización, la molécula indicadora y la molécula de interrupción se sitúan en el HO y el CTO de modo que una señal de la molécula indicadora se interrumpe con la molécula de interrupción cuando el HO se hibrida con CTO. La escisión del HO inducida por extensión del primer fragmento permite la liberación del HO del CTO y separar la molécula indicadora de la molécula de interrupción y a continuación la molécula de interrupción para interrumpir la señal de la molécula indicadora, proporcionando de ser una señal que indica la presencia de la hebra extendida.

40 De acuerdo con una realización, es necesario detectar la señal a temperaturas que permitan la hibridación entre el HO y el CTO.

En una realización, el HO se puede diseñar para que tenga una estructura de horquilla.

45 En cierta realización, una de la molécula indicadora y la molécula de interrupción se une al extremo en la posición 3' terminal del HO and y la otra se une al extremo en la posición 5' terminal del CTO.

50 De acuerdo con una realización, el sistema de etiqueta tal como etiqueta doble interactiva que usa dos HO se puede usar en el presente método que usa HO. La etiqueta doble interactiva se puede situar en cualquier sitio en los dos HO, siempre y cuando el HO escindido y el HO no escindido puedan proporcionar señales de diferenciación. Los tipos y situaciones de las etiquetas se pueden describir con referencia a las descripciones para el SO.

55 De acuerdo con una realización, el sistema de etiqueta tal como etiqueta de FRET que usaba colorantes de intercalado se puede usar en el presente método que usa HO. La etiqueta de FRET se puede situar en cualquier sitio en el HO, siempre y cuando el HO escindido y el HO no escindido puedan proporcionar señales de diferenciación en presencia del colorante de intercalado. Los tipos y situaciones de las etiquetas se pueden describir con referencia a las descripciones para el SO.

DetECCIÓN MEDIANTE TAMAÑO O SECUENCIA DE HEBRA EXTENDIDA

60 De acuerdo con una realización, la hebra extendida del primer fragmento se puede detectar basándose en cualquiera del tamaño o secuencia de la hebra extendida. Por ejemplo, la hebra extendida se puede detectar usando electroforesis o un análisis de masas (por ejemplo, impacto electrónico (EI), ionización química (CI), Desorción de Campo (FD), desorción de plasma 252Cf (PD), desorción por ionización química (DCI), espectrometría de masas de ion secundario (SIMS), bombardeo atómico rápido (FAB), ionización por electronebulización (ESI), ionización por desorción de láser asistida por matriz (MALDI) y Espectrometría de Masas en Tándem).

65

- 5 El PTO-NV y CTO pueden estar formados por los dNMP de origen natural. Como alternativa, el PTO-NV y CTO pueden estar formados por nucleótido modificado o nucleótido no natural tal como PNA (ácido nucleico peptídico, véase la Publicación de PCT N.º WO 92/20702) y LNA (ácido nucleico bloqueado, véanse las Publicaciones de PCT N.ºs WO 98/22489, WO 98/39352 y WO 99/14226). El PTO-NV y CTO pueden comprender bases universales tales como desoxiinosina, inosina, 1-(2'-desoxi-beta-D-ribofuranosil)-3-nitropirrol y 5-nitroindol. La expresión "base universal" se refiere a una capaz de formar pares de bases con cada una de las bases de ADN/ARN naturales con poca diferenciación entre ellas.
- 10 De acuerdo con una realización, el método comprende adicionalmente repetir todas o algunas de las etapas (a)-(e) con desnaturalización entre ciclos de repetición. La repetición de la reacción va acompañada por la amplificación de la secuencia de ácidos nucleicos diana. Preferentemente, la amplificación se realiza de acuerdo con PCR (reacción en cadena de la polimerasa) que se desvela en los documentos de Patente de Estados Unidos N.ºs 4.683.195, 4.683.202, y 4.800.159.
- 15 De acuerdo con una realización, el método comprende adicionalmente repetir las etapas (a)-(b), (a)-(d) o (a)-(e) con desnaturalización entre ciclos de repetición. Por ejemplo, el método se puede realizar mediante repetición de las etapas (a)-(b), (a)-(d) o (a)-(e) durante varios ciclos, por ejemplo, 2-80 ciclos, 2-50 ciclos, 2-40 ciclos, 10-80 ciclos, 10-50 ciclos, 10-40 ciclos, 20-80 ciclos, 20-50 ciclos, 20-40 ciclos, 30-60 ciclos o 40-60 ciclos con desnaturalización entre ciclos de repetición, y a continuación realizando la etapa (e). Por ejemplo, el método también se puede realizar repitiendo las etapas (a)-(b) durante varios ciclos, por ejemplo, 2-80 ciclos, 2-50 ciclos, 2-40 ciclos, 10-80 ciclos, 10-50 ciclos, 10-40 ciclos, 20-80 ciclos, 20-50 ciclos, 20-40 ciclos, 30-60 ciclos o 40-60 ciclos con desnaturalización entre ciclos de repetición, y a continuación realizando las etapas (c)-(e).
- 20 La desnaturalización se puede realizar mediante tecnologías convencionales, que incluyen, pero no se limitan a, calentamiento, álcali, formamida, urea tratamiento con glicoxal, métodos enzimáticos (por ejemplo, acción de helicasa), y proteínas de unión. Por ejemplo, la fusión se puede conseguir calentando a una temperatura que varía de 80 °C a 105 °C. Los métodos generales para conseguir ese tratamiento se proporcionan en Joseph Sambrook, et ál., Molecular Cloning, A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y.(2001).
- 25 De acuerdo con una realización, las etapas (a)-(e) se realizan en un recipiente de reacción o en recipientes de reacción separados. Por ejemplo, las etapas (a)-(b), (c)-(d) o (e) se pueden realizar en recipientes de reacción separados.
- 30 De acuerdo con una realización, las etapas (a)-(e) se pueden realizar de forma simultánea o por separado incluso en un recipiente de reacción dependiendo de las condiciones de reacción (en particular, temperatura). Por ejemplo las etapas (a)-(b) y (c)-(e) se pueden realizar de forma simultánea o por separado incluso en un recipiente de reacción dependiendo de las condiciones de reacción (en particular, temperatura).
- 35 De acuerdo con una realización, la amplificación selectiva usando el bloqueador de amplificación y el par de cebadores que comprende el cebador cadena arriba y el cebador cadena abajo, y la detección de la variación de nucleótido diana usando la escisión del PTO-NV se puede realizar por separado en recipientes de reacción separados o incluso en un recipiente de reacción dependiendo de condiciones de reacción (en particular, temperatura).
- 40 Cuando se realiza en recipientes de reacción separados, el PTO-NV se puede escindir de forma independiente en un oligonucleótido cadena arriba, o de una forma dependiente en una sonda cadena arriba.
- 45 La presente invención no necesita que las secuencias de ácidos nucleicos diana a detectar y/o amplificar tengan ninguna secuencia o longitud en particular, incluyendo cualquier molécula de ADN (ADNg y ADNc) y ARN.
- 50 Cuando un ARNm se usa como material de partida, una etapa de transcripción inversa es necesaria antes de realizaba etapa de hibridación, cuyos detalles se encuentran en Joseph Sambrook, et ál., Molecular Cloning, A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y.(2001); y Noonan, K. F. et ál., Nucleic Acids Res. 16:10366 (1988). A la transcripción inversa se puede usar un hexámero aleatorio o un Cebador de oligonucleótido dT que se pueda hibridar al ARNm.
- 55 Las secuencias de ácidos nucleicos diana que se pueden detectar y/o amplificar incluyen cualquier procarionta de origen natural, eucariota (por ejemplo, protozoos y parásitos, hongos, levadura, plantas superiores, animales inferiores y superiores, incluyendo mamíferos y seres humanos) o virus (por ejemplo, virus del Herpes, VIH, virus de la gripe, virus Epstein-Barr, virus de la hepatitis, virus de la polio, etc.) o ácido nucleico viroide.
- 60 La secuencia de ácidos nucleicos diana a detectar con la presente invención incluye una gran diversidad de secuencias de ácidos nucleicos, por ejemplo, secuencias en un genoma, secuencias artificialmente aisladas o fragmentadas y secuencias sintetizadas (por ejemplo, secuencias de ADNc y secuencias de código de barras). Por ejemplo, la secuencia de ácidos nucleicos diana incluye secuencias de marcador de ácido nucleico para Inmuno-PCR (IPCR). La IPCR usa conjugados entre secuencias de marcador de ácido nucleico y anticuerpos junto con
- 65

PCR, que se aplica ampliamente para detectar diversos tipos de dianas incluyendo proteínas (véase Sano et ál., Science 258 pp: 120-122 (1992), documento de Patente de Estados Unidos N.º 5.665.539, Niemeyer et ál., Trends in Biotechnology 23 pp: 208-216 (2005), Pub. de Pat. de Estados Unidos N.º 2005/0239108 e Ye et ál., Journal of Environmental Science 22 pp: 796-800 (2010)).

5 Las ventajas de la presente invención se pueden destacar en la detección simultánea (multiplexada) de al menos dos tipos de variaciones de nucleótidos.

10 De acuerdo con una realización, el método se realiza para detectar al menos dos tipos (más preferentemente, al menos tres tipos, aún más preferentemente al menos cinco tipos) de variaciones de nucleótidos; en el que el cebador cadena arriba y el cebador cadena abajo comprenden al menos dos tipos (más preferentemente, al menos tres tipos, aún más preferentemente al menos cinco tipos) de cebadores cadena arriba y cebadores cadena abajo, el bloqueador de amplificación comprende al menos dos tipos (más preferentemente, al menos tres tipos, aún más preferentemente al menos cinco tipos) de bloqueadores de amplificación, y el PTO-NV comprende al menos dos tipos (más preferentemente, al menos tres tipos, aún más preferentemente al menos cinco tipos) de los PTO-NV.

#### Detección de Variación de Nucleótido Usando Oligonucleótido Inmovilizado sobre una Fase Sólida

20 La presente invención también es eficaz para detectar variaciones de nucleótido sobre una fase sólida tal como una micromatriz.

25 De acuerdo con una realización, la presente invención se realiza sobre la fase sólida y un oligonucleótido (por ejemplo, CTO, SO o HO) se inmoviliza a través de su extremo en la posición 5' terminal o extremo en la posición 3' terminal sobre un sustrato sólido. En una fase sólida, se mide la señal diana proporcionada sobre el sustrato sólido.

La inmovilización del CTO, SO o HO se puede realizar de dos formas.

30 En la primera forma, el CTO, SO o HO que ya se han inmovilizado sobre el sustrato sólido se implica en las etapas de reacción. En la segunda forma, el CTO, SO o HO se implica en una forma no inmovilizada y a continuación se inmoviliza sobre el sustrato sólido durante las etapas de reacción.

35 De acuerdo con una realización, en la reacción en fase sólida, no es necesario que la etiqueta individual tenga la capacidad de generar señales de diferentes intensidades dependiendo de si la secuencia de ácidos nucleico que tiene la etiqueta individual se encuentra en una sola hebra o en una doble hebra. La etiqueta individual incluye, pero no se limita a, una etiqueta química (por ejemplo, biotina), una etiqueta enzimática (por ejemplo, fosfatasa alcalina, peroxidasa,  $\beta$ -galactosidasa y  $\beta$ -glucosidasa), una etiqueta de radioisótopo (por ejemplo,  $^{125}\text{I}$  y  $\text{C}^{14}$ ), una etiqueta fluorescente, una etiqueta luminiscente, una etiqueta quimioluminiscente, y una etiqueta metálica (por ejemplo, oro).

40 Para la reacción en fase sólida, el CTO, SO o HO se inmoviliza directa o indirectamente (preferentemente indirectamente) a través de su extremo en la posición 5' terminal o extremo en la posición 3' terminal (preferentemente el extremo en la posición 3' terminal) sobre la superficie del sustrato sólido. Además, el CTO, SO o HO se puede inmovilizar sobre la superficie del sustrato sólido que una forma covalente o no covalente. Cuando los oligonucleótidos inmovilizados se inmovilizan indirectamente sobre la superficie del sustrato sólido, se usan conectores adecuados. Los conectores útiles en la presente invención pueden incluir cualquier conector utilizado para inmovilización de sonda sobre la superficie del sustrato sólido. Por ejemplo, como conectores para inmovilización sirven los compuestos de alquilo o arilo con grupo funcional amina, o compuestos de alquilo o arilo con grupo funcional tiol. Además, la cola de poli (T) o la cola de poli (A) puede servir como conector y disminuir de forma significativa el impedimento espacial que es un factor inhibitorio para las acciones enzimáticas (por ejemplo, reacciones de escisión enzimática), que contribuyen a aumentar la eficacia de la hibridación. La cola de poli (T) o la cola de poli (A) como conectores no se considera una secuencia de sondas.

55 De acuerdo con una realización, el CTO, SO o HO se puede inmovilizar sobre el sustrato sólido mediante interacción entre asociados de unión (por ejemplo, biotina/estreptavidina). Por ejemplo, el CTO, SO o HO con uno de los asociados de unión (biotina y estreptavidina) se pueden inmovilizar sobre el sustrato sólido cuya superficie se modifica con el otro asociado de unión.

60 De acuerdo con una realización, el CTO, SO o HO se puede inmovilizar sobre el sustrato sólido mediante una secuencia de nucleótidos para inmovilización. Por ejemplo, el sustrato sólido cuya superficie se modifica con la secuencia de nucleótidos para inmovilización se puede usar para inmovilizar el CTO, SO o HO con una secuencia adicional complementaria a La secuencia de nucleótidos para inmovilización.

65 De acuerdo con una realización, el sustrato sólido usado en la presente invención es una micromatriz. La micromatriz para proporcionar un entorno de reacción en la presente invención puede incluir cualquiera de las conocidas para alguien con experiencia en la materia. Todos los procesos de la presente invención, es decir, hibridación a secuencias de ácidos nucleicos diana, escisión, extensión, fusión y detección de fluorescencia, se realizan en la micromatriz. Los oligonucleótidos inmovilizados en la micromatriz sirven como elementos de matriz

que se pueden hibridar. El sustrato sólido para fabricar una micromatriz incluye, pero no se limita, metales (por ejemplo, oro, aleación de oro y cobre, aluminio), óxido metálico, vidrio, cerámica, cuarzo, silicio, semiconductor, oblea de Si/SiO<sub>2</sub>, germanio, arseniuro de galio, carbono, nanotubo de carbono, polímeros (por ejemplo, poliestireno, polietileno, polipropileno y poliacrilamida), Sepharose, agarosa y coloides. El sustrato sólidos se puede encontrar en forma de una varilla, una placa, una partícula (por ejemplo, perla), una columna de afinidad y una membrana. En la presente invención una pluralidad de oligonucleótidos inmovilizados se pueden inmovilizar con una región dirigible o dos o más regiones dirigibles sobre un sustrato sólido que puede comprender o 2-1.000.000 regiones dirigibles. Los oligonucleótidos inmovilizados se pueden fabricar para producir una matriz o matrices para una aplicación dada mediante tecnologías de fabricación convencionales tales como fotolitografía, inyección de tinta, microaplicación puntual mecánica, y derivados de las mismas.

La presente invención realizada sobre la fase sólida puede detectar de forma simultánea una pluralidad de secuencias de ácidos nucleicos diana incluso usando un solo tipo de etiqueta ya que las etiquetas en los oligonucleótidos inmovilizadas se separan físicamente. En este sentido, el número de secuencias de ácidos nucleicos diana a detectar con la presente invención sobre la fase sólida no está limitado.

Usando dispositivos de detección confocal, la señal únicamente sobre el sustrato sólido se puede detectar sin influencia de etiquetas suspendidas en una fase líquida.

#### Kits para Detección de Variación de Nucleótido Diana

En otro aspecto de la presente invención, se proporciona un kit para detectar una variación de nucleótido diana en una secuencia de ácidos nucleicos diana usando bloqueador de amplificación y ensayo de VD-PTOCE, que comprende:

(a) un par de cebadores que comprende un cebador cadena arriba y un cebador cadena abajo para amplificación del ácido nucleico diana; en el que cada uno del cebador cadena arriba y el cebador cadena abajo comprende una secuencia de nucleótidos de hibridación complementaria a la secuencia de ácidos nucleicos diana;

(b) un bloqueador de amplificación que tiene la resistencia a la escisión por 5' nucleasa; en el que el bloqueador de amplificación comprende una secuencia complementaria a una variación de nucleótido no diana que es diferente de la variación de nucleótido diana en la secuencia de ácidos nucleicos diana; y

(c) un PTO-NV (Oligonucleótido de Sondeo y Etiquetado para Variación de Nucleótido); en el que y el PTO-NV comprende (i) una porción de dirección en la posición 3' que comprende una secuencia de nucleótidos de hibridación complementaria a la secuencia de ácidos nucleicos diana, (ii) una porción de etiquetado en la posición 5' que comprende una secuencia de nucleótidos no complementaria a la secuencia de ácidos nucleicos diana, y (iii) un sitio de diferenciación de variación de nucleótido, que comprende una secuencia complementaria a la variación de nucleótido diana en el ácido nucleico diana, colocada en una parte en el extremo en la posición 5' terminal de la porción de dirección en la posición 3';

(d) un CTO (Oligonucleótido de Captura y Formación de Molde); en el que el CTO comprende, en una dirección de la posición 3' a la posición 5' (i) una porción de captura que comprende una secuencia de nucleótidos complementaria a la porción de etiquetado en la posición 5' o una parte de la porción de etiquetado en la posición 5' del PTO-NV y (ii) una porción de formación de molde que comprende una secuencia de nucleótidos no complementaria a la porción de etiquetado en la posición 5' y la porción de dirección en la posición 3' del PTO-NV; en el que el primer fragmento o el segundo fragmento liberado del PTO-NV se hibrida con la porción de captura del CTO;

en el que el bloqueador de amplificación se hibrida con la secuencia de ácidos nucleicos diana que tiene la variación de nucleótido no diana y no se hibrida con la secuencia de ácidos nucleicos diana que tiene la variación de nucleótido diana; en el que la porción de dirección en la posición 3' del PTO-NV se hibrida con la secuencia de ácidos nucleicos diana y la porción de etiquetado en la posición 5' del PTO-NV no se hibrida con la secuencia de ácidos nucleicos diana;

en el que el cebador cadena arriba se sitúa cadena arriba del PTO-NV; el bloqueador de amplificación se sitúa cadena abajo del cebador cadena arriba o el cebador cadena abajo; y el bloqueador de amplificación y el PTO-NV se sitúan entre el cebador cadena arriba o el cebador cadena abajo;

en el que el cebador cadena arriba induce a través de su hebra extendida la escisión del PTO-NV por la enzima que tiene la actividad de 5' nucleasa; en el que la hibridación del bloqueador de amplificación a la secuencia de ácidos nucleicos diana que tiene la variación de nucleótido no diana inhibe la extensión del cebador situado cadena arriba del bloqueador de amplificación, dando como resultado el bloqueo de la amplificación de la secuencia de ácidos nucleicos diana que tiene la variación de nucleótido no diana;

en el que cuando el PTO-NV se hibrida con la secuencia de ácidos nucleicos diana que tiene la variación de nucleótido diana complementaria al sitio de diferenciación de variación de nucleótido, la parte en el extremo 5' terminal de la porción de dirección en la posición 3' forma una doble hebra con la secuencia de ácidos nucleicos diana para inducir la escisión desde un primer sitio de escisión inicial y se libera un primer fragmento; en el que cuando el PTO-NV se hibrida con la secuencia de ácidos nucleicos diana que tiene la variación de nucleótido no diana no complementaria al sitio de diferenciación de variación de nucleótido, la parte en el extremo 5' terminal de la porción de dirección en la posición 3' no forma una doble hebra con la secuencia de ácidos nucleicos diana para

inducir la escisión desde un segundo sitio de escisión inicial situado cadena abajo del primer sitio de escisión inicial y se libera un segundo fragmento; en el que el segundo fragmento comprende una porción adicional en el extremo en la posición 3' terminal que permite que el segundo fragmento sea diferente al primer fragmento; en el que cuando el primer fragmento se hibrida con la porción de captura del CTO, se extiende para formar una hebra extendida que comprende una secuencia extendida complementaria a la porción de formación de molde del CTO; en el que cuando el segundo fragmento se hibrida con la porción de captura del CTO, no se extiende.

Dado que el kit de la presente invención se construye para realizar el método de detección de la presente invención descrito anteriormente, las descripciones comunes entre ellos se omiten para evitar una redundancia expresiva que conduzca a la complejidad de la presente memoria descriptiva.

De acuerdo con una realización, el kit comprende adicionalmente la enzima que tiene la actividad de 5' nucleasa, una ácido nucleico polimerasa dependiente de molde o sus combinaciones.

De acuerdo con una realización, el bloqueador de amplificación comprende nucleósidos/nucleótidos que tienen una estructura principal resistente a la actividad de 5' nucleasa.

De acuerdo con una realización, el bloqueador de amplificación comprende ácido nucleico peptídico (PNA), ácido nucleico bloqueado (LNA), Morfolino, ácido nucleico glicólico (GNA), ácido nucleico treósico (TNA), ácidos nucleicos unidos por puente (BNA), oligómeros de N3'-P5' fosforamidato (NP), oligonucleótidos unidos a agente de unión a surco menor (oligonucleótidos unidos a MGB), oligómeros de fosforotioato (PS), oligómeros de fosfonato de alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>4</sub>, fosforamidatos, oligonucleótidos de β-fosfodiéster, oligonucleótidos de α-fosfodiéster o combinación de los mismos.

De acuerdo con una realización, el CTO tiene una secuencia seleccionada de modo que el CTO no se hibrida con la porción adicional en el extremo 3' terminal del segundo fragmento para evitar la extensión del segundo fragmento cuando el segundo fragmento se hibrida con la de captura del CTO.

De acuerdo con una realización, el sitio de diferenciación de variación de nucleótido se sitúa a 10 nucleótidos de separación del extremo en la posición 5' terminal de la porción de dirección en la posición 3' del PTO-NV.

De acuerdo con una realización, la parte en el extremo 5' terminal de la porción de dirección en la posición 3' del PTO-NV comprende un resto de no emparejamiento de bases situado a 1-5 nucleótidos de separación del sitio de diferenciación de variación de nucleótido; en la que el resto de no emparejamiento de bases mejora la diferenciación entre el primer sitio de escisión inicial y el segundo sitio de escisión inicial.

De acuerdo con una realización, el resto de no emparejamiento de bases es (i) un nucleótido que comprende una base con falta de coincidencias artificial, una base de no emparejamiento de bases modificada para que sea incapaz de emparejamiento de bases o una base universal, (ii) un nucleótido de no emparejamiento de bases modificado para que sea incapaz de emparejamiento de bases, o (iii) un compuesto químico de no emparejamiento de bases.

De acuerdo con una realización, la variación de nucleótidos es una variación por sustitución, una variación por delección o una variación por inserción.

De acuerdo con una realización, la hebra extendida del primer fragmento y el CTO forman un ácido nucleico bicatenario extendido; en el que el ácido nucleico bicatenario extendido tiene un valor de  $T_m$  ajustable por (i) una secuencia y/o longitud del primer fragmento, (ii) una secuencia y/o longitud del CTO o (iii) la secuencia y/o longitud del primer fragmento y la secuencia y/o longitud del CTO; en el que el ácido nucleico bicatenario extendido proporciona una señal diana por (i) al menos una etiqueta unida al primer fragmento y/o CTO, (ii) una etiqueta incorporada en el ácido nucleico bicatenario extendido durante la reacción de extensión, (iii) al menos una etiqueta unida al primer fragmento y/o CTO y una etiqueta incorporada en el ácido nucleico bicatenario extendido durante la reacción de extensión o (iv) etiqueta de intercalado; y en el que la presencia de la hebra extendida se detecta por medición de la señal diana del ácido nucleico bicatenario extendido de acuerdo con un análisis de fusión o un análisis de hibridación para el ácido nucleico bicatenario extendido.

De acuerdo con una realización, la hebra extendida del primer fragmento y el CTO forman un ácido nucleico bicatenario extendido; en el que el ácido nucleico bicatenario extendido tiene un valor de  $T_m$  ajustable por (i) una secuencia y/o longitud del primer fragmento, (ii) una secuencia y/o longitud del CTO o (iii) la secuencia y/o longitud del primer fragmento y la secuencia y/o longitud del CTO; en el que el ácido nucleico bicatenario extendido proporciona una señal diana por (i) al menos una etiqueta unida al primer fragmento y/o CTO, (ii) una etiqueta incorporada en el ácido nucleico bicatenario extendido durante la reacción de extensión, (iii) al menos una etiqueta unida al primer fragmento y/o CTO y una etiqueta incorporada en el ácido nucleico bicatenario extendido durante la reacción de extensión o (iv) etiqueta de intercalado; y en el que la presencia de la hebra extendida se detecta por medición de la señal diana del ácido nucleico bicatenario extendido a una temperatura determinada previamente suficiente como para mantener una doble hebra del ácido nucleico bicatenario extendido.

De acuerdo con una realización, el kit comprende adicionalmente un oligonucleótido de señalización (SO) para detectar la hebra extendida del primer fragmento; en el que el SO comprende una secuencia complementaria a la hebra extendida y al menos una etiqueta; el SO proporciona una señal detectable por asociación con o disociación de la hebra extendida. De acuerdo con una realización, la señal detectable es proporcionada por (i) la etiqueta unida al SO, (ii) una combinación de la etiqueta unida al SO y una etiqueta unida al fragmento del PTO-NV, (iii) una combinación de la etiqueta unida al SO y una etiqueta a incorporar en la hebra extendida durante la reacción de extensión, o (iv) una combinación de la etiqueta unida al SO y un colorante de intercalado. De acuerdo con una realización, el kit usa un SO adicional que comprende una secuencia complementaria a la hebra extendida, los dos SO se hibridan con la hebra extendida de una forma adyacente, cada uno de los dos SO comprende una etiqueta entre una molécula indicadora y una molécula de interrupción de una etiqueta doble interactiva.

De acuerdo con una realización, el kit comprende adicionalmente un HO (oligonucleótido de hibridación) para detectar la hebra extendida del primer fragmento; en el que el HO comprende una secuencia de nucleótidos de hibridación complementaria al CTO y al menos una etiqueta; en el que la extensión del primer fragmento induce la escisión del HO por una enzima que tiene una actividad de 5' nucleasa para generar una señal detectable de la etiqueta. De acuerdo con una realización, la señal detectable es proporcionada por (i) una etiqueta doble interactiva unida al HO, o (ii) una de una etiqueta doble interactiva que comprende una molécula indicadora y una molécula de interrupción unida al HO y la otra unida al CTO.

De acuerdo con una realización, el bloqueador de amplificación, PTO-NV, CTO, SO y/o HO se bloquea en su extremo en la posición 3' terminal para prohibir su extensión.

De acuerdo con una realización, el kit se realiza para detectar al menos dos tipos de variaciones de nucleótidos; en el que el cebador cadena arriba y el cebador cadena abajo comprenden al menos dos tipos de cebadores cadena arriba y cebadores cadena abajo, el bloqueador de amplificación comprende al menos dos tipos de bloqueadores de amplificación, y el PTO-NV comprende al menos dos tipos de PTO-NV.

De acuerdo con una realización, la ácido nucleico polimerasa dependiente de molde es la misma que la enzima que tiene la actividad de 5' nucleasa.

De acuerdo con una realización, la enzima que tiene la actividad de 5' nucleasa es una ADN polimerasa termoestable que tiene una actividad de 5' nucleasa o FEN nucleasa.

Todos los kits presentes que se han descrito anteriormente en el presente documento pueden incluir opcionalmente los reactivos necesarios para realizar las reacciones de PCR de amplificación debían (por ejemplo, reacciones de PCR) tales como tampones, cofactores de ADN polimerasa, y desoxiribonucleótido-5-trifosfatos. Opcionalmente, los kits también pueden incluir diversas moléculas de polinucleótido, transcriptasa inversa, diversos hampones y reactivos, y anticuerpos que inhiben la actividad de ADN polimerasa. Los kits también pueden incluir reactivos necesarios para realizar reacciones de control positivo y negativo. El experto en la materia que tiene el beneficio de la presente divulgación puede determinar fácilmente las cantidades óptimas de los reactivos a usar en una reacción dada. Los kits, generalmente, se adaptan para que contengan los componentes descritos anteriormente en envases o compartimentos separados.

Las características y ventajas de la presente invención se resumirán como sigue a continuación:

- (a) La presente invención es una mejora de un ensayo de VD-PTOCE desarrollado por los presentes inventores, que tiene como objeto la detección eficaz de alelos secundarios de baja abundancia.
- (b) La presente invención es significativamente eficaz en la detección de una mutación minoritaria en un exceso de ADN de tipo silvestre. El bloqueador de amplificación puede limitar el consumo del PTO-NV en el ADN de tipo silvestre mediante la amplificación selectiva del ADN mutante. O, el bloqueador de amplificación puede competir con el PTO-NV por la hibridación del ADN de tipo silvestre, que evita la escisión del PTO-NV en el ADN de tipo silvestre.
- (c) De acuerdo con la presente invención, la sonda (PTO-NV) muestra patrones de hibridación claramente diferentes dependiendo de la presencia de variación de nucleótido de interés.
- (d) los patrones de hibridación distintos de este tipo en la variación de nucleótido de interés son responsables de diferencias en sitios de escisión inicial del PTO-NV, produciendo de ese modo dos tipos de fragmentos de PTO-NV para proporcionar diferenciación de señales dependiendo de la presencia de la variación de nucleótidos de interés.
- (e) Se debe tener en cuenta que la secuencia de la porción de etiquetado en la posición 5' de PTO-NV y la secuencia de CTO se puede seleccionar sin considerar las secuencias de ácidos nucleicos diana. Esto hace que sea posible el diseño previo de una combinación de secuencias para la porción de etiquetado en la posición 5' de PTO-NV y CTO. Aunque la porción de dirección en la posición 3' del PTO-NV se tiene que preparar considerando las secuencias de ácidos nucleicos diana, el CTO se puede preparar en una forma preparada sin consideración o conocimiento de las secuencias de ácidos nucleicos diana. Las características de este tipo proporcionan ventajas importantes en detección de múltiples dianas, entre otros, en un ensayo de micromatriz que usa los CTO inmovilizados sobre un sustrato sólido.

La presente invención se describirá a continuación con detalles adicionales mediante los ejemplos. Para los expertos en la materia podría ser evidente que estos ejemplos pretenden ser ilustrativo de la forma más concreta y el alcance de la presente invención como se establece en las reivindicaciones adjuntas no se limita o por los ejemplos.

## 5 Ejemplos

**EJEMPLO 1:** Detección de una mutación minoritaria con un ensayo de VD-PTOCE con un bloqueador de amplificación.

10 Los inventores examinaron si la combinación del bloqueador de amplificación y el ensayo de VD-PTOCE permite identificar una mutación minoritaria en un exceso de ADN de tipo silvestre.

15 La Taq ADN polimerasa que tiene una actividad de 5' nucleasa se usó para la extensión de cebador cadena arriba y cebador cadena abajo, la escisión de PTO-NV y la extensión del fragmento de PTO-NV. El PTO-NV, bloqueador de amplificación y CTO se bloquean con un espaciador de carbono en sus extremos en la posición 3' terminal para prohibir su extensión. Los ADN genómico humanos de tipo silvestre (T) y mutante (A) de BRAF (V600E) se usaron como secuencias de ácidos nucleicos diana. El ADN mutante se correspondía con una secuencia de ácidos nucleicos diana que tiene la variación de nucleótido diana y el ADN de tipo silvestre con una secuencia de ácidos nucleicos diana que tiene la variación de nucleótido no diana. Una serie de mezclas que tenían diferentes proporciones de ADN de BRAF mutante y de tipo silvestre se prepararon (mutante al 100 %, 10 %, 1 %, 0,1 % y al 0 %) para examinar el defecto del bloqueador de amplificación.

20 El PTO-NV no tienen etiquetas. El sitio de diferenciación de variación de nucleótido de PTO-NV tiene un nucleótido (T) complementario al ADN mutante (A) ADN de la hebra codificante (SEQ ID NO: 3). El bloqueador de amplificación incluye nucleótidos de LNA y el sitio de diferenciación de variación de nucleótido del bloqueador de amplificación tiene un nucleótido (T) complementario al ADN de tipo silvestre (A) de la hebra no codificante (SEQ ID NO: 4).

25 En el ensayo de VD-PTOCE del presente Ejemplo, la presencia de la hebra extendida producida dependiendo de la presencia de la variación de nucleótido diana (es decir, ADN mutante) se detectó mediante análisis de fusión del ácido nucleico bicatenario extendido formado con la hebra extendida y CTO.

30 El CTO se etiqueta con una molécula de interrupción (BHQ-2) y una molécula indicadora fluorescente (Cal Fluor Red 610) en su porción de formación de molde (SEQ ID NO: 5).

35 Las secuencias de cebador cadena arriba, cebador cadena abajo, PTO-NV, bloqueador de amplificación y CTO usadas en el presente Ejemplo son:

40 BRAF-F 5'-CTTCATAATGCTTGCTCTGATAGGIIIIIGAGATCTACT-3' (SEQ ID NO: 1)  
 BRAF-R 5'-ATAGCCTCAATTCTTACCATCCAIIIITGGATCCAGA-3' (SEQ ID NO: 2)  
 BRAF-PTO-NV  
 5'-GGTGGACTTGCGGTCTGTAGCTAGACCAAATCACCTATTTTTACTGTG[espaciador C3]-3'  
 (SEQ ID NO: 3)  
 Bloqueador de amplificación 5'-CAGTGAAATCTCGATGG[espaciador C3]-3' (SEQ ID NO: 4)  
 45 BRAF-CTO-1 5'-[BHQ-2]TTTTTTTTGAGCCAGAGTTA[T(Cal Fluor Red  
 610)]GGTCACCGCAAGTCCACC[espaciador C3]-3' (SEQ ID NO: 5)  
 (I: Desoxiinosina)  
 (Las letras subrayadas indican la porción de etiquetado en la posición 5' de PTO-NV)  
 (La letra en negrita indica el sitio de diferenciación de nucleótido)  
 (Las letras en caja indican nucleótidos de LNA)

50 La reacción se realizó en el volumen final de 20 µl que contenía 100 ng de diferentes proporciones de mezcla de ADN genómicos humanos mutante (A) y de tipo silvestre (T) de BRAF (V600E) (mutante al 100 %, 10 %, 1 %, 0,1 % y al 0 %), 10 pmoles de cebador cadena arriba (SEQ ID NO: 1), 10 pmoles de cebador cadena abajo (SEQ ID NO: 2), 5 pmoles de PTO-NV (SEQ ID NO: 3), 5 pmoles de bloqueador de amplificación (SEQ ID NO: 4), 1 pmol de CTO (SEQ ID NO: 5), y 10 µl de Mezcla Maestra 2X [que contenía MgCl<sub>2</sub> 2,5 mM, 200 µM de dNTPs y 1,6 unidades de Taq ADN polimerasa (Solgent, Corea)]; el tubo que contenía la mezcla de reacción se puso en el aparato de termociclado en tiempo real (CFX96, Bio-Rad); la mezcla de reacción se desnaturalizó durante 15 min a 95 °C y se sometió a 50 ciclos de 30 s a 95 °C, 60 s a 60 °C. Después de la reacción, la curva de fusión se obtuvo enfriando la mezcla de reacción a 55 °C, manteniendo a 55 °C durante 10 min, y calentando lentamente de 55 °C a 85 °C. La fluorescencia se midió continuamente durante el aumento de temperatura para controlar la disociación de los ADN bicatenarios. El pico de fusión se obtuvo a partir de los datos de la curva de fusión.

65 Como se muestra en las Figuras 8A y 8B, en presencia de las secuencias de ácidos nucleicos diana, los picos que corresponden al valor de T<sub>m</sub> esperado de los ácidos nucleicos bicatenarios extendidos se detectaron hasta un 10 % de proporción de mutante en el ensayo de VD-PTOCE sin el bloqueador de amplificación, pero hasta un 0,1 % de proporción de mutante con el bloqueador de amplificación. No se detectaron picos en ausencia de ninguna diana.

Estos resultados muestran que el uso del bloqueador de amplificación mejora la capacidad del ensayo de VD-PTOCE para identificar una mutación minoritaria en un exceso de ADN de tipo silvestre.

**EJEMPLO 2:** Detección de la mutación minoritaria con un ensayo de VD-PTOCE usando un oligonucleótido de señalización con un bloqueador de amplificación.

Los inventores examinaron adicionalmente si la combinación del bloqueador de amplificación y el ensayo de VD-PTOCE usando oligonucleótido de señalización (SO) permite identificar una mutación minoritaria en un exceso de ADN de tipo silvestre.

En el ensayo de VD-PTOCE del presente Ejemplo, la presencia de la hebra extendida producida dependiendo de la presencia de la variación de nucleótido diana (es decir, ADN mutante) se detectó usando el oligonucleótido de señalización (SO) que se hibrida de forma específica con la hebra extendida. El híbrido entre la hebra extendida y el SO se usó para el análisis de fusión.

Los cebadores, bloqueador de amplificación, PTO-NV, ADN genómico humano de BRAF y *Taq* ADN polimerasa se usaron como en el Ejemplo 1.

El CTO no tiene etiqueta (SEQ ID NO: 6). El SO tiene una molécula de interrupción (BHQ-2) en su extremo en la posición 5' terminal y tiene una molécula indicadora fluorescente (Cal Fluor Red 610) en su extremo en la posición 3' terminal (SEQ ID NO: 7).

Las secuencias de cebador cadena arriba, cebador cadena abajo, PTO-NV, bloqueador de amplificación, CTO y SO usadas en el presente Ejemplo son:

BRAF-F 5'-CTTCATAATGCTTGCTCTGATAGGIIIIIGAGATCTACT-3' (SEQ ID NO: 1)  
 BRAF-R 5'-ATAGCCTCAATTCTTACCATCCAIIIIIITGGATCCAGA-3' (SEQ ID NO: 2)  
 BRAF-PTO-NV  
 5'-GGTGGACTTGCGGTCTGTAGCTAGACCAAATCACCTATTTTTACTGTG[espaciador C3]-3' (SEQ ID NO: 3)  
 Bloqueador de amplificación 5'-CAGTGAAATCTCGAT-GG[espaciador C3]-3' (SEQ ID NO: 4)  
 BRAF-CTO-2 5'-TTTTTTTTGAGCCAGAGTTATGGTCCACCGCAAGTCCACC[espaciador C3]-3' (SEQ ID NO: 6)  
 BRAF-SO 5'-[BHQ-2]TTTTTTTGGAGCCAGAGTTATGGTC[Cal Fluor Red 610]-3' (SEQ ID NO: 7)  
 (I: Desoxiinosina)  
 (Las letras subrayadas indican la porción de etiquetado en la posición 5' de PTO-NV)  
 (La letra en negrita indica el sitio de diferenciación de nucleótido)  
 (Las letras en caja indican nucleótidos de LNA)

La reacción se realizó en el volumen final de 20 µl que contenía 100 ng de diferentes proporciones de mezcla de ADN genómicos humanos mutante (A) y de tipo silvestre (T) de BRAF (V600E) (mutante al 100 %, 10 %, 1 % y al 0 %), 10 pmoles de cebador cadena arriba (SEQ ID NO: 1), 10 pmoles de cebador cadena abajo (SEQ ID NO: 2), 5 pmoles de PTO-NV (SEQ ID NO: 3), 5 pmoles de bloqueador de amplificación (SEQ ID NO: 4), 0,1 pmoles de CTO (SEQ ID NO: 6), 3 pmoles de SO (SEQ ID NO: 7) y 10 µl de Mezcla Maestra 2X [que contenía MgCl<sub>2</sub> 2,5 mM, 200 µM de dNTPs y 1,6 unidades de *Taq* ADN polimerasa (Solgent, Corea)]; el tubo que contenía la mezcla de reacción se puso en el aparato de termociclado en tiempo real (CFX96, Bio-Rad); la mezcla de reacción se desnaturalizó durante 15 min a 95 °C y se sometió a 50 ciclos de 30 s a 95 °C, 60 s a 60 °C. Después de la reacción, la curva de fusión se obtuvo enfriando la mezcla de reacción a 40 °C, manteniendo a 40 °C durante 10 min, y calentando lentamente de 40 °C a 85 °C. La fluorescencia se midió continuamente durante el aumento de temperatura para controlar la disociación de un híbrido de SO de hebra extendida. El pico de fusión se obtuvo a partir de los datos de la curva de fusión.

Como se muestra en las Figuras 9A y 9B, en presencia de las secuencias de ácidos nucleicos diana, el pico que corresponde al valor de  $T_m$  esperado de la hebra extendida/híbrido de SO se detectó hasta un 100 % de proporción de mutante pero no hasta un 10 % de proporción de mutante en el ensayo de VD-PTOCE usando SO sin el bloqueador de amplificación. Sin embargo, los picos se detectaron hasta un 1 % de proporción de mutante con el bloqueador de amplificación. No se detectaron picos en ausencia de ninguna diana.

Estos resultados muestran que el uso del bloqueador de amplificación mejora la capacidad del ensayo de VD-PTOCE usando SO para identificar una mutación minoritaria en un exceso de ADN de tipo silvestre.

**EJEMPLO 3:** Detección de una mutación minoritaria con un ensayo de VD-PTOCE usando un oligonucleótido de hibridación con un bloqueador de amplificación.

Los inventores examinaron adicionalmente si la combinación del bloqueador de amplificación y el ensayo de VD-PTOCE usando oligonucleótido de hibridación (HO) permite identificar una mutación minoritaria en un exceso de ADN de tipo silvestre.

En el ensayo de VD-PTOCE del presente Ejemplo, la presencia de la hebra extendida producida dependiendo de la presencia de la variación de nucleótido diana (es decir, ADN mutante) se detectó usando el oligonucleótido de hibridación (HO) que se hibrida específicamente con el CTO en la posición cadena abajo que el fragmento de PTO-NV. Durante la extensión del fragmento de PTO-NV en el CTO, el HO se escinde y proporciona una señal. La señal generada por la escisión de HO se detectó mediante detección en tiempo real a una temperatura determinada previamente en cada ciclo.

Los cebadores, bloqueador de amplificación, PTO-NV, ADN genómico humano de BRAF y *Taq* ADN polimerasa se usaron como Ejemplo 1.

El CTO no tiene etiqueta (SEQ ID NO: 8). El HO tiene una molécula de interrupción (BHQ-2) en su extremo en la posición 5' terminal y tiene una molécula indicadora fluorescente (Cal Fluor Red 610) en su extremo en la posición 3' terminal (SEQ ID NO: 9).

Las secuencias de cebador cadena arriba, cebador cadena abajo, PTO-NV, bloqueador de amplificación, CTO y HO usadas en el presente Ejemplo son:

BRAF-F 5'-CTTCATAATGCTTGCTCTGATAGGIIIIIGAGATCTACT-3' (SEQ ID NO: 1)  
 BRAF-R 5'-ATAGCCTCAATTCTTACCATCCAIIIIIITGGATCCAGA-3' (SEQ ID NO: 2)  
 BRAF-PTO-NV  
 5'-GGTGGACTTGCGGTCTGTAGCTAGACCAAATCACCTATTTTTACTGTG[espaciador C3]-3' (SEQ ID NO: 3)  
 Bloqueador de amplificación 5'-CAGTGAAATCTCGATGG[espaciador C3]-3' (SEQ ID NO: 4)  
 BRAF-CTO-3 5'-TCCGTCCGAGCCAGAGTGATGGTCACTCACCGCAAGTCCACC[espaciador C3]-3'  
 (SEQ ID NO: 8)  
 BRAF-HO 5'-[BHQ-2]GACCATCACTCTGGCTCGGACGGA[Cal Fluor Red 610]-3' (SEQ ID NO: 9)  
 (I: Desoxiinosina)  
 (Las letras subrayadas indican la porción de etiquetado en la posición 5' de PTO-NV)  
 (La letra en negrita indica el sitio de diferenciación de nucleótido)  
 (Las letras en caja indican nucleótidos de LNA).

La reacción se realizó en el volumen final de 20 µl que contenía 100 ng de diferentes proporciones de mezcla de ADN genómicos humanos mutante (A) y de tipo silvestre (T) de BRAF (V600E) (mutante al 100 %, 10 %, 1 %, 0,1 % y al 0 %), 10 pmoles de cebador cadena arriba (SEQ ID NO: 1), 10 pmoles de cebador cadena abajo (SEQ ID NO: 2), 5 pmoles de PTO-NV (SEQ ID NO: 3), 5 pmoles de bloqueador de amplificación (SEQ ID NO: 4), 1 pmol de CTO (SEQ ID NO: 8), 3 pmoles de HO (SEQ ID NO: 9) y 10 µl de Mezcla Maestra 2X [que contenía MgCl<sub>2</sub> 2,5 mM, 200 µM de dNTPs y 1,6 unidades de *Taq* ADN polimerasa (Solgent, Corea)]; el tubo que contenía la mezcla de reacción se puso en el aparato de termociclado en tiempo real (CFX96, Bio-Rad); la mezcla de reacción se desnaturizó durante 15 min a 95 °C y se sometió a 50 ciclos de 30 s a 95 °C, 60 s a 55 °C. La detección de una señal generada se realizó en la etapa de desnaturización (95 °C) de cada ciclo. La detección a la temperatura de desnaturización (95 °C) apoya que la señal detectada se proporciona a partir del fragmento etiquetado generado por la escisión de HO.

Como se muestra en las Figuras 10A y 10B, en presencia de las secuencias de ácidos nucleicos diana, la señal fluorescente se detectó hasta un 10 % de proporción de mutante el ensayo de VD-PTOCE usando HO sin el bloqueador de amplificación, pero hasta un 0,1 % de proporción de mutante con el bloqueador de amplificación. No se detectó señal en ausencia de ninguna diana.

Estos resultados muestran que el uso del bloqueador de amplificación mejora la capacidad del ensayo de VD-PTOCE usando HO para identificar una mutación minoritaria en un exceso de ADN de tipo silvestre.

Habiendo descrito una realización preferente de la presente invención, se debe entender que las variantes y modificaciones de la misma entran dentro del alcance de la invención se van a determinar con las reivindicaciones adjuntas y sus equivalentes.

<110> SEEGENE, INC.

<120> DETECCIÓN DE VARIACIÓN DE NUCLEÓTIDO EN UNA SECUENCIA DE ÁCIDOS NUCLEICOS DIANA

<130> PU140019EP

<150> US 61/827.966

<151> 28-05-2013

<150> PCT/KR 2013/001492

<151> 25-02-2013

<160> 9

<170> KopatentIn 2.0

5 <210> 1  
<211> 39  
<212> ADN  
<213> Secuencia artificial

10 <220>  
<223> BRAF-F

<220>  
15 <221> misc\_feature  
<222> (25)..(29)  
<223> n indica desoxiinosina

<400> 1  
cttcataatg cttgctctga taggnnnng agatctact 39

20 <210>2  
<211> 38  
<212> ADN  
<213> Secuencia artificial

25 <220>  
<223> BRAF-R

<220>  
30 <221> misc\_feature  
<222> (24)..(28)  
<223> n indica desoxiinosina

<400> 2  
atagcctcaa ttctaccat ccannnnntg  
35 gatccaga 38

<210> 3  
<211> 49  
<212> ADN  
40 <213> Secuencia artificial

<220>  
<223> BRAF-PTO-NV

45 <400> 3  
ggtggacttg cggctctgag ctagaccaa atcacctatt  
tttactgtg 49

<210> 4  
<211> 17  
<212> ADN  
50 <213> Secuencia artificial

<220>  
<223> Bloqueador de amplificación

55 <400> 4  
cagtgaaatc tcgatgg 17

<210>5  
60 <211> 39  
<212> ADN  
<213> Secuencia artificial

<220>  
 <223> BRAF-CTO-1  
  
 <400> 5  
 5 ttttttga gccagagtta tggcaccgc aagtcacc 39  
  
 <210>6  
 <211> 39  
 <212> ADN  
 10 <213> Secuencia artificial  
  
 <220>  
 <223> BRAF-CTO-2  
  
 15 <400> 6  
 ttttttga gccagagtta tggcaccgc aagtcacc 39  
  
 <210>7  
 <211> 24  
 20 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial  
  
 <220>  
 <223> BRAF-SO  
 25 <400> 7  
 ttttttgag ccagagttat ggtc 24  
  
 <210>8  
 <211> 43  
 30 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial  
  
 <220>  
 <223> BRAF-CTO-3  
 35 <400> 8  
 tccgtccgag ccagagtgat ggtcacctca ccgcaagtcc acc  
 43  
  
 40 <210>9  
 <211> 24  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial  
  
 45 <220>  
 <223> BRAF-HO  
  
 <400> 9  
 50 gaccatcact ctggctcgga cgga 24

## REIVINDICACIONES

1. Un método para detectar una variación de nucleótido diana en una secuencia de ácidos nucleicos diana usando un bloqueador de amplificación y un ensayo de VD-PTOCE (Detección de Variación por Escisión y Extensión de PTO), que comprende:

(a) hibridar la secuencia de ácidos nucleicos diana con un par de cebadores que comprende un cebador cadena arriba y un cebador cadena abajo para amplificación del ácido nucleico diana, bloqueador de amplificación que presenta la resistencia a la escisión por 5' nucleasa y un PTO-NV (Oligonucleótido de Sondeo y Etiquetado para Variación de Nucleótido); en la que cada uno del cebador cadena arriba y el cebador cadena abajo comprende una secuencia de nucleótidos de hibridación complementaria a la secuencia de ácidos nucleicos diana; el bloqueador de amplificación comprende una secuencia complementaria a una variación de nucleótido no diana diferente a la variación de nucleótido diana en la secuencia de ácidos nucleicos diana y el PTO-NV comprende (i) una porción de dirección en la posición 3' que comprende una secuencia de nucleótidos de hibridación complementaria a la secuencia de ácidos nucleicos diana, (ii) una porción de etiquetado en la posición 5' que comprende una secuencia de nucleótidos no complementaria a la secuencia de ácidos nucleicos diana, y (iii) un sitio de diferenciación de variación de nucleótido que comprende una secuencia complementaria a la variación de nucleótido diana en el ácido nucleico diana, colocada en una parte en el extremo 5' terminal de la porción de dirección en la posición 3';

en la que el bloqueador de amplificación se hibrida con la secuencia de ácidos nucleicos diana que tiene la variación de nucleótido no diana y no se hibrida con la secuencia de ácidos nucleicos diana que tiene la variación de nucleótido diana; en el que la porción de dirección en la posición 3' del PTO-NV se hibrida con la secuencia de ácidos nucleicos diana y la porción de etiquetado en la posición 5' del PTO-NV no se hibrida con la secuencia de ácidos nucleicos diana;

en el que el cebador cadena arriba se sitúa cadena arriba del PTO-NV; el bloqueador de amplificación se sitúa cadena abajo del cebador cadena arriba o el cebador cadena abajo; y el bloqueador de amplificación y el PTO-NV se sitúan entre el cebador cadena arriba y el cebador cadena abajo;

(b) poner en contacto el producto resultante de la etapa (a) con una enzima que tiene una actividad de 5' nucleasa en condiciones para la escisión del PTO-NV; en el que el cebador cadena arriba induce a través de su hebra extendida la escisión del PTO-NV por la enzima que tiene la actividad de 5' nucleasa; en el que la hibridación del bloqueador de amplificación con la secuencia de ácidos nucleicos diana que tiene la variación de nucleótido no diana inhibe la extensión del cebador situado cadena arriba del bloqueador de amplificación, bloqueando de ese modo la amplificación de la secuencia de ácidos nucleicos diana que tiene la variación de nucleótido no diana;

en el que cuando el PTO-NV se hibrida con la secuencia de ácidos nucleicos diana que tiene la variación de nucleótido diana complementaria al sitio de diferenciación de variación de nucleótido, la parte en el extremo 5' terminal de la porción de dirección en la posición 3' forma una doble hebra con la secuencia de ácidos nucleicos diana para inducir la escisión desde un primer sitio de escisión inicial y se libera un primer fragmento; en el que cuando el PTO-NV se hibrida con la secuencia de ácidos nucleicos diana que tiene la variación de nucleótido no diana no complementaria al sitio de diferenciación de variación de nucleótido, la parte en el extremo 5' terminal de la porción de dirección en la posición 3' no forma una doble hebra con la secuencia de ácidos nucleicos diana para inducir la escisión desde un segundo sitio de escisión inicial situado cadena abajo del primer sitio de escisión inicial y se libera un segundo fragmento; en el que el segundo fragmento comprende una porción adicional en el extremo en la posición 3' terminal que permite que el segundo fragmento sea diferente al primer fragmento;

(c) hibridar el fragmento liberado del PTO-NV con un CTO (Oligonucleótido de Captura y Formación de Molde); en el que el CTO comprende, en una dirección de la posición 3' a la posición 5' (i) una porción de captura que comprende una secuencia de nucleótidos complementaria a la porción de etiquetado en la posición 5' o una parte de la porción de etiquetado en la posición 5' del PTO-NV y (ii) una porción de formación de molde que comprende una secuencia de nucleótidos no complementaria a la porción de etiquetado en la posición 5' y la porción de dirección en la posición 3' del PTO-NV; en el que el primer fragmento o el segundo fragmento liberado del PTO-NV se hibrida con la porción de captura del CTO;

(d) realizar una reacción de extensión usando el producto resultante de la etapa (c) y una ácido nucleico polimerasa dependiente de molde; en el que cuando el primer fragmento se hibrida con la porción de captura del CTO, se extiende para formar una hebra extendida que comprende una secuencia extendida complementaria a la porción de formación de molde del CTO; en el que cuando el segundo fragmento se hibrida con la porción de captura del CTO, no se extiende; y

(e) detectar la presencia de la hebra extendida, de modo que la presencia de la hebra extendida indica la presencia de la variación de nucleótido diana.

2. El método de acuerdo con la reivindicación 1, en el que el bloqueador de amplificación comprende nucleósidos/nucleótidos que tienen una estructura principal resistente a la actividad de 5' nucleasa.

3. El método de acuerdo con la reivindicación 1, en el que el bloqueador de amplificación comprende ácido nucleico peptídico (PNA), ácido nucleico bloqueado (LNA), Morfolino, ácido nucleico glicólico (GNA), ácido nucleico treósico (TNA), ácidos nucleicos unidos por puente (BNA), oligómeros de N3'-P5' fosforamidato (NP), oligonucleótidos unidos

a agente de unión a surco menor (oligonucleótidos unidos a MGB), oligómeros de fosforotioato (PS), oligómeros de alquilfosfonato C<sub>1</sub>-C<sub>4</sub>, fosforamidatos, oligonucleótidos de β-fosfodiéster, oligonucleótidos de α-fosfodiéster o combinación de los mismos.

- 5 4. El método de acuerdo con la reivindicación 1, en el que el CTO tiene una secuencia seleccionada de modo que el CTO no se hibrida con la porción adicional en el extremo 3' terminal del segundo fragmento para evitar la extensión del segundo fragmento cuando el segundo fragmento se hibrida con la porción de captura del CTO.
- 10 5. El método de acuerdo con la reivindicación 1, en el que el sitio de diferenciación de variación de nucleótidos se sitúa a 10 nucleótidos de separación del extremo en la posición 5' terminal de la porción de dirección en la posición 3' del PTO-NV.
- 15 6. El método de acuerdo con la reivindicación 1, en el que la parte en el extremo 5' terminal de la porción de dirección en la posición 3' del PTO-NV comprende un resto de no emparejamiento de bases situado a 1-5 nucleótidos de separación del sitio de diferenciación de variación de nucleótido; en el que el resto de no emparejamiento de bases mejora la diferenciación entre el primer sitio de escisión inicial y el segundo sitio de escisión inicial.
- 20 7. El método de acuerdo con la reivindicación 6, en el que el resto de no emparejamiento de bases es (i) un nucleótido que comprende una base con falta de coincidencias artificial, una base de no emparejamiento de bases modificada para que sea incapaz de emparejamiento de bases o una base universal, (ii) un nucleótido de no emparejamiento de bases modificado para que sea incapaz de emparejamiento de bases, o (iii) un compuesto químico de no emparejamiento de bases.
- 25 8. El método de acuerdo con la reivindicación 1, en el que la variación de nucleótidos es una variación por sustitución, una variación por delección o una variación por inserción.
- 30 9. El método de acuerdo con la reivindicación 1, en el que la hebra extendida del primer fragmento y el CTO forman un ácido nucleico bicatenario extendido en la etapa (d); en el que el ácido nucleico bicatenario extendido tiene un valor de T<sub>m</sub> ajustable por (i) una secuencia y/o longitud del primer fragmento, (ii) una secuencia y/o longitud del CTO o (iii) la secuencia y/o longitud del primer fragmento y la secuencia y/o longitud del CTO; en el que el ácido nucleico bicatenario extendido proporciona una señal diana por (i) al menos una etiqueta unida al primer fragmento y/o CTO, (ii) una etiqueta incorporada en el ácido nucleico bicatenario extendido durante la reacción de extensión, (iii) al menos una etiqueta unida al primer fragmento y/o CTO y una etiqueta incorporada en el ácido nucleico bicatenario extendido durante la reacción de extensión o (iv) etiqueta de intercalado; y en el que la presencia de la hebra extendida se detecta por medición de la señal diana del ácido nucleico bicatenario extendido de acuerdo con un análisis de fusión o un análisis de hibridación para el ácido nucleico bicatenario extendido.
- 35 10. El método de acuerdo con la reivindicación 1, en el que la hebra extendida del primer fragmento y el CTO forman un ácido nucleico bicatenario extendido en la etapa (d); en el que el ácido nucleico bicatenario extendido tiene un valor de T<sub>m</sub> ajustable por (i) una secuencia y/o longitud del primer fragmento, (ii) una secuencia y/o longitud del CTO o (iii) la secuencia y/o longitud del primer fragmento y la secuencia y/o longitud del CTO; en el que el ácido nucleico bicatenario extendido proporciona una señal diana por (i) al menos una etiqueta unida al primer fragmento y/o CTO, (ii) una etiqueta incorporada en el ácido nucleico bicatenario extendido durante la reacción de extensión, (iii) al menos una etiqueta unida al primer fragmento y/o CTO y una etiqueta incorporada en el ácido nucleico bicatenario extendido durante la reacción de extensión o (iv) etiqueta de intercalado; y en el que la presencia de la hebra extendida se detecta por medición de la señal diana del ácido nucleico bicatenario extendido a una temperatura determinada previamente suficiente como para mantener una doble hebra del ácido nucleico bicatenario extendido.
- 40 11. El método de acuerdo con la reivindicación 1, en el que la hebra extendida del primer fragmento se detecta usando un oligonucleótido de señalización (SO); en el que el SO comprende una secuencia complementaria a la hebra extendida y al menos una etiqueta; el SO proporciona una señal detectable por asociación con o disociación de la hebra extendida.
- 45 12. El método de acuerdo con la reivindicación 11, en el que la señal detectable es proporcionada por (i) la etiqueta unida al SO, (ii) una combinación de la etiqueta unida al SO y una etiqueta unida al fragmento del PTO, (iii) una combinación de la etiqueta unida al SO y una etiqueta a incorporar en la hebra extendida durante la reacción de extensión de la etapa (d), o (iv) una combinación de la etiqueta unida al SO y un colorante de intercalado.
- 50 13. El método de acuerdo con la reivindicación 11, en la que el método usa un SO adicional que comprende una secuencia complementaria a la hebra extendida, los dos SO se hibridan con la hebra extendida de una forma adyacente, cada uno de los dos SO comprende una etiqueta entre una molécula indicadora y una molécula de interrupción de una etiqueta doble interactiva.
- 55 14. El método de acuerdo con la reivindicación 1, en el que la hebra extendida del primer fragmento se detecta usando un HO (oligonucleótido de hibridación); en la que el HO comprende una secuencia de nucleótidos de

hibridación complementaria al CTO y al menos una etiqueta; en el que la extensión del primer fragmento induce la escisión del HO por una enzima que tiene una actividad de 5' nucleasa para generar una señal detectable de la etiqueta.

5 15. El método de acuerdo con la reivindicación 14, en el que la señal detectable es proporcionada por (i) una etiqueta doble interactiva unida al HO, o (ii) una de una etiqueta doble interactiva que comprende una molécula indicadora y una molécula de interrupción unida al HO y la otra unida al CTO.

10 16. El método de acuerdo con la reivindicación 1, en el que el bloqueador de amplificación, PTO-NV y/o CTO se bloquean en su extremo en la posición 3' terminal para prohibir su extensión.

17. El método de acuerdo con la reivindicación 1, en el que el método comprende adicionalmente repetir todas o algunas de las etapas (a)-(e) con desnaturalización entre ciclos de repetición.

15 18. El método de acuerdo con la reivindicación 1, en el que el método se realiza para detectar al menos dos tipos de variaciones de nucleótidos; en el que el cebador cadena arriba y el cebador cadena abajo comprenden al menos dos tipos de cebadores cadena arriba y cebadores cadena abajo, el bloqueador de amplificación comprende al menos dos tipos de bloqueadores de amplificación, y el PTO-NV comprende al menos dos tipos de PTO-NV.

20 19. El método de acuerdo con la reivindicación 1, en el que la etapa (b) usa una ácido nucleico polimerasa dependiente de molde para la extensión de los cebadores; en el que la ácido nucleico polimerasa dependiente de molde es la misma que la enzima que tiene la actividad de 5' nucleasa.

25 20. El método de acuerdo con la reivindicación 1, en el que la etapa (b) usa una ácido nucleico polimerasa dependiente de molde para la extensión de los cebadores; en el que la ácido nucleico polimerasa dependiente de molde es diferente de la enzima que tiene la actividad de 5' nucleasa.

30 21. El método de acuerdo con la reivindicación 1, en el que la enzima que tiene la actividad de 5' nucleasa es una ADN polimerasa termoestable que tiene una actividad de 5' nucleasa o FEN nucleasa.

22. Un kit para detectar una variación de nucleótido diana en una secuencia de ácidos nucleicos diana usando un bloqueador de amplificación y un ensayo de VD-PTOCE para uso en el método de una cualquiera de las reivindicaciones 1-21, que comprende:

35 (a) un par de cebadores que comprende un cebador cadena arriba y un cebador cadena abajo para amplificación del ácido nucleico diana; en el que cada uno del cebador cadena arriba y el cebador cadena abajo comprende una secuencia de nucleótidos de hibridación complementaria a la secuencia de ácidos nucleicos diana;

40 (b) un bloqueador de amplificación que tiene la resistencia a la escisión por 5' nucleasa; en el que el bloqueador de amplificación comprende una secuencia complementaria a una variación de nucleótido no diana diferente a la variación de nucleótido diana en la secuencia de ácidos nucleicos diana; y

45 (c) un PTO-NV (Oligonucleótido de Sondeo y Etiquetado para Variación de Nucleótido); en el que el PTO-NV comprende (i) una porción de dirección en la posición 3' que comprende una secuencia de nucleótidos de hibridación complementaria a la secuencia de ácidos nucleicos diana, (ii) una porción de etiquetado en la posición 5' que comprende una secuencia de nucleótidos no complementaria a la secuencia de ácidos nucleicos diana, y (iii) un sitio de diferenciación de variación de nucleótido, que comprende una secuencia complementaria a la variación de nucleótido diana en el ácido nucleico diana, colocada en una parte en el extremo en la posición 5' terminal de la porción de dirección en la posición 3';

50 (d) un CTO (Oligonucleótido de Captura y Formación de Molde); en el que el CTO comprende, en una dirección de la posición 3' a la posición 5' (i) una porción de captura que comprende una secuencia de nucleótidos complementaria a la porción de etiquetado en la posición 5' o una parte de la porción de etiquetado en la posición 5' del PTO-NV y (ii) una porción de formación de molde que comprende una secuencia de nucleótidos no complementaria a la porción de etiquetado en la posición 5' y la porción de dirección en la posición 3' del PTO-NV; en el que el primer fragmento o el segundo fragmento liberado del PTO-NV se hibrida con la porción de captura del CTO;

55 en el que el bloqueador de amplificación se hibrida con la secuencia de ácidos nucleicos diana que tiene la variación de nucleótido no diana y no se hibrida con la secuencia de ácidos nucleicos diana que tiene la variación de nucleótido diana; en el que la porción de dirección en la posición 3' del PTO-NV se hibrida con la secuencia de ácidos nucleicos diana y la porción de etiquetado en la posición 5' del PTO-NV no se hibrida con la secuencia de ácidos nucleicos diana; en el que el cebador cadena arriba se sitúa cadena arriba del PTO-NV; el bloqueador de amplificación se sitúa cadena abajo del cebador cadena arriba o el cebador cadena abajo; y el bloqueador de amplificación y el PTO-NV se sitúan entre el cebador cadena arriba o el cebador cadena abajo;

60 en el que el cebador cadena arriba induce a través de su hebra extendida la escisión del PTO-NV por la enzima que tiene la actividad de 5' nucleasa; en el que la hibridación del bloqueador de amplificación a la secuencia de ácidos nucleicos diana que tiene la variación de nucleótido no diana inhibe la extensión del cebador situado cadena arriba

del bloqueador de amplificación, bloqueando de ese modo la amplificación de la secuencia de ácidos nucleicos diana que tiene la variación de nucleótido no diana;

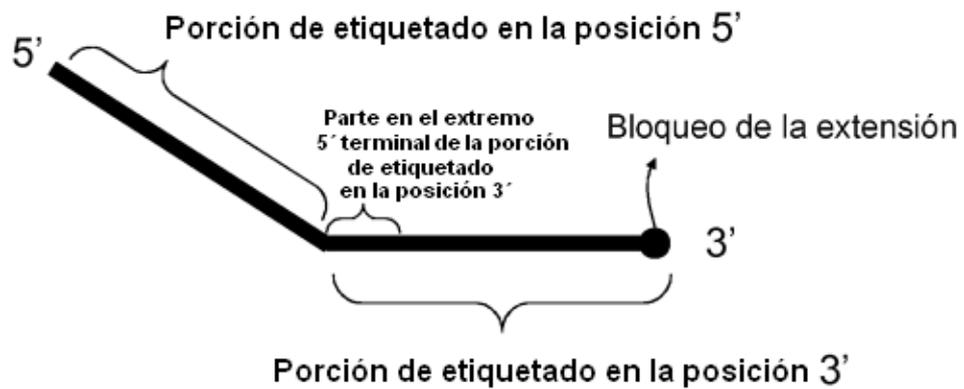
5 en el que cuando el PTO-NV se hibrida con la secuencia de ácidos nucleicos diana que tiene la variación de nucleótido diana complementaria al sitio de diferenciación de variación de nucleótido, la parte en el extremo 5' terminal de la porción de dirección en la posición 3' forma una doble hebra con la secuencia de ácidos nucleicos diana para inducir la escisión desde un primer sitio de escisión inicial y se libera un primer fragmento; en el que

10 cuando el PTO-NV se hibrida con la secuencia de ácidos nucleicos diana que tiene la variación de nucleótido no diana no complementaria al sitio de diferenciación de variación de nucleótido, la parte en el extremo 5' terminal de la porción de dirección en la posición 3' no forma una doble hebra con la secuencia de ácidos nucleicos diana para inducir la escisión desde un segundo sitio de escisión inicial situado cadena abajo del primer sitio de escisión inicial y se libera un segundo fragmento; en el que el segundo fragmento comprende una porción adicional en el extremo en la posición 3' terminal que permite que el segundo fragmento sea diferente al primer fragmento;

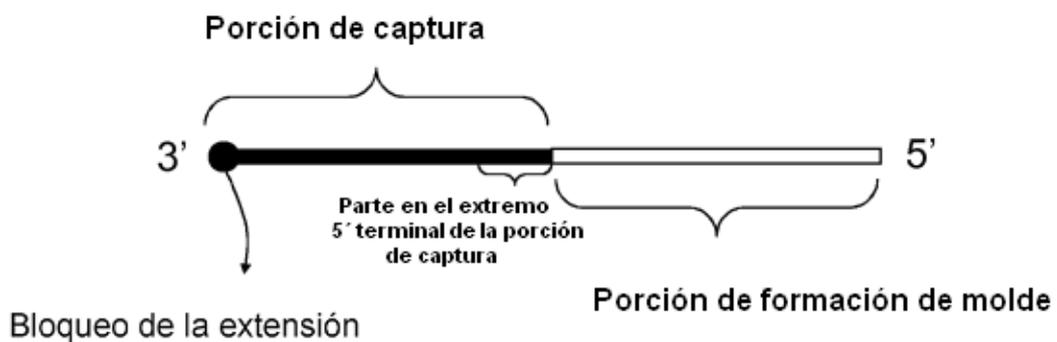
15 en el que cuando el primer fragmento se hibrida con la porción de captura del CTO, se extiende para formar una hebra extendida que comprende una secuencia extendida complementaria a la porción de formación de molde del CTO; en el que cuando el segundo fragmento se hibrida con la porción de captura del CTO, no se extiende.

**Fig. 1**

**A. Oligonucleótido de Sondeo y Etiquetado (PTO)**



**B. Oligonucleótido de Captura y Formación de Molde (CTO)**



**Fig. 2**

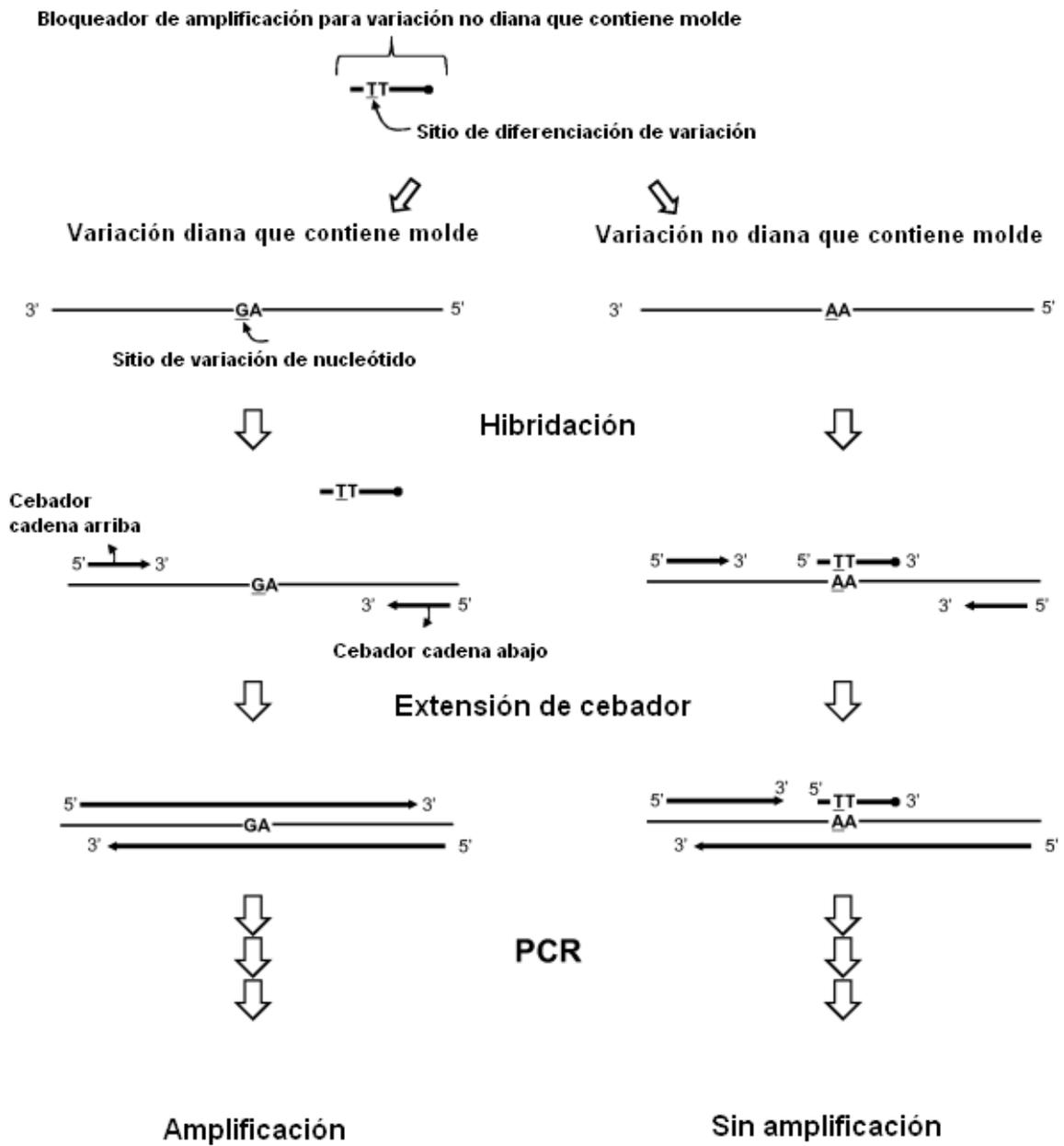


Fig. 3

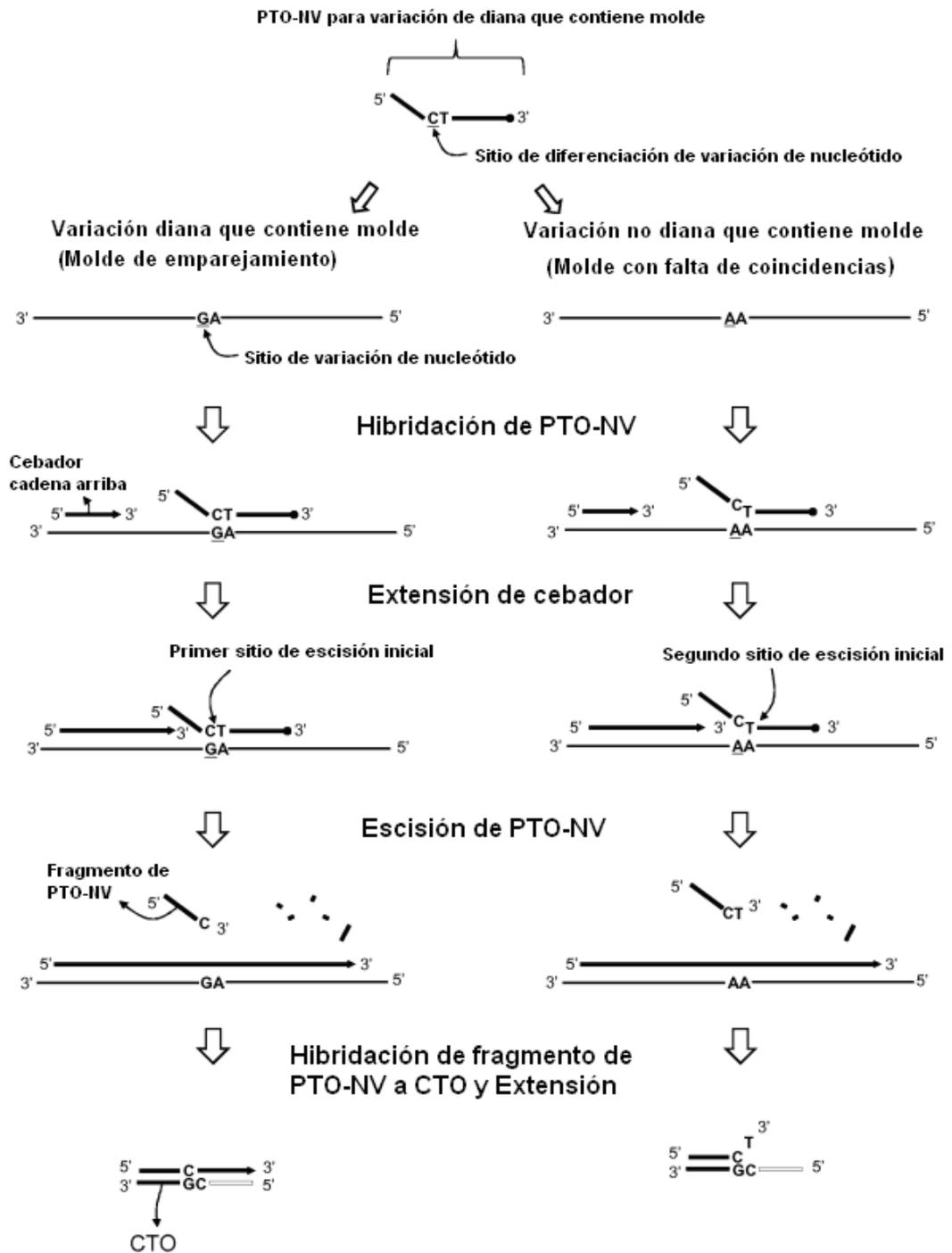
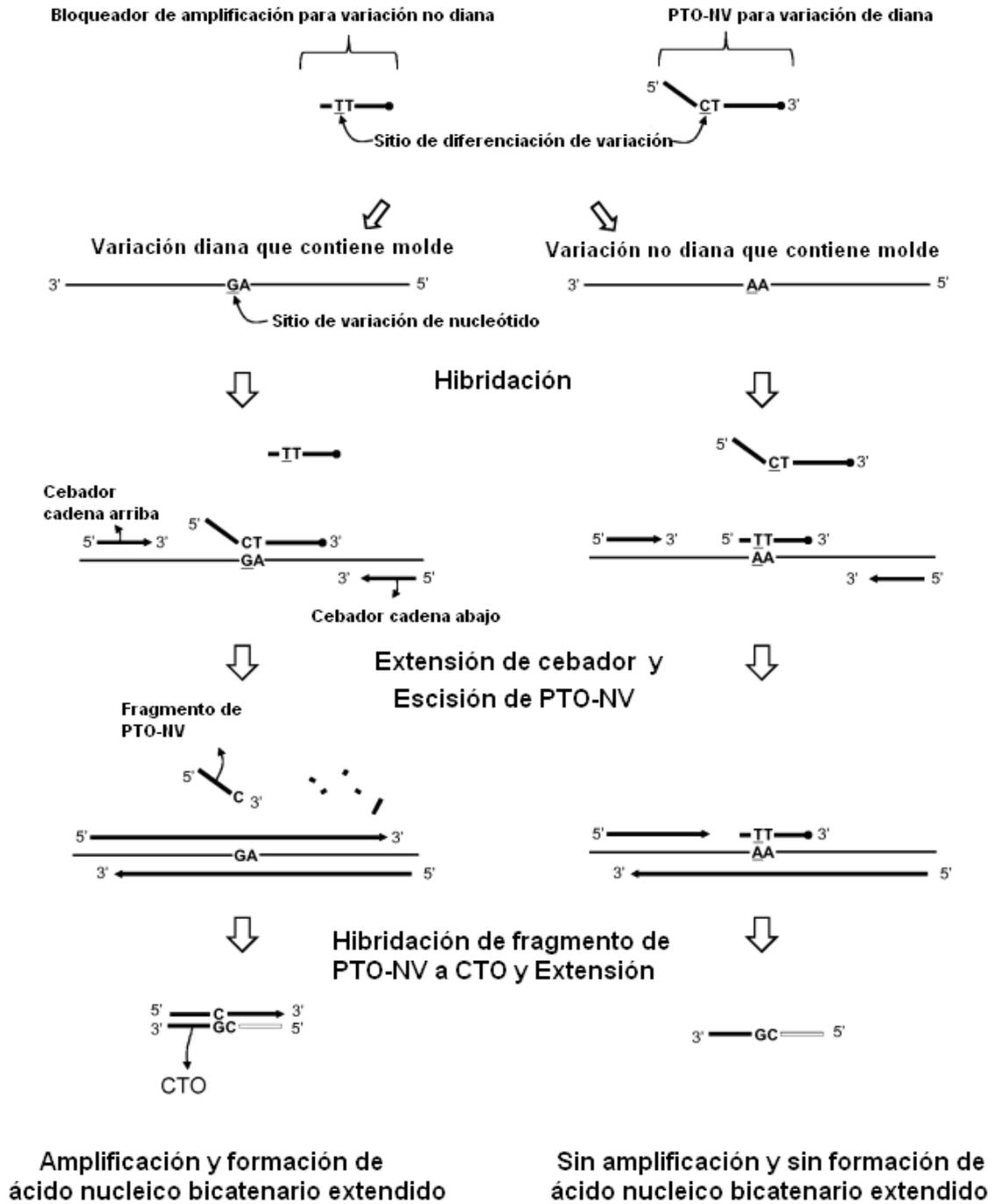
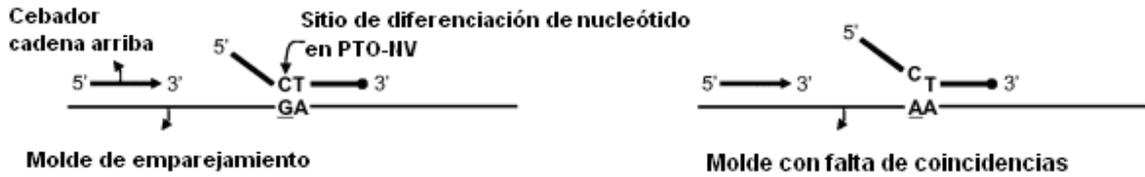


Fig. 4

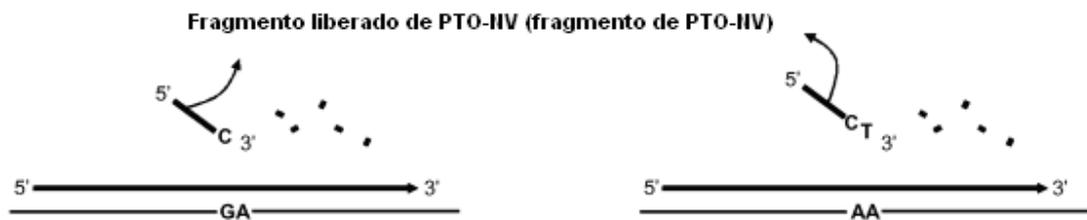


**Fig. 5**

**A. Hibridación**



**B. Extensión del cebador y Escisión de PTO-NV**



**C. Hibridación de fragmento de PTO-NV a CTO**



**D. Extensión de fragmento de PTO-NV y Detección**

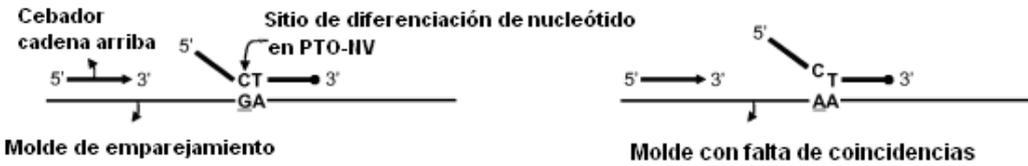


**E. (Opcional) Análisis de fusión**

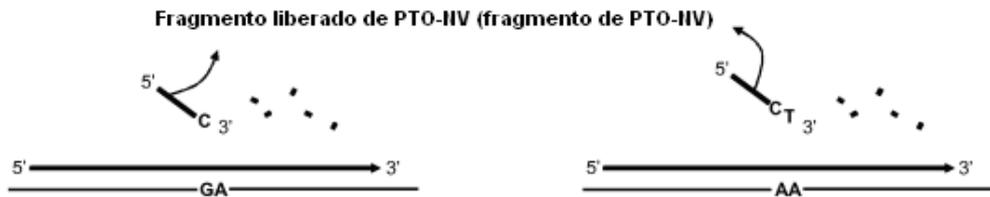


Fig. 6

**A. Hibridación**



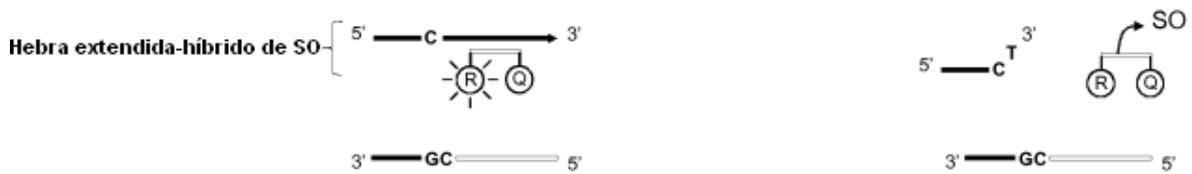
**B. Extensión del cebador y Escisión de PTO-IV**



**C. Hibridación de fragmento de PTO-NV a CTO y Extensión**



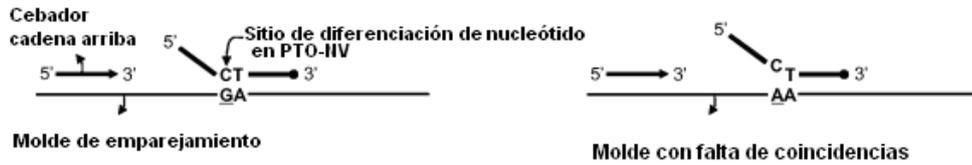
**D. Hibridación de SO a hebra extendida y Detección**



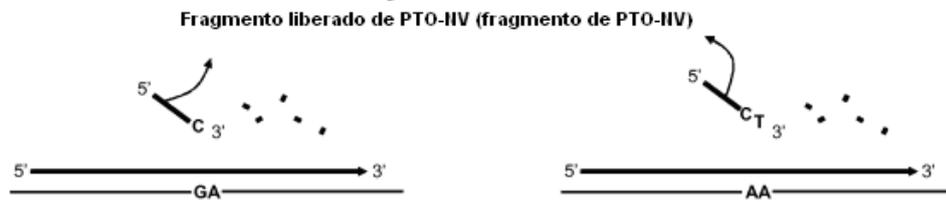
**E. (Opcional) Análisis de fusión**

Fig. 7

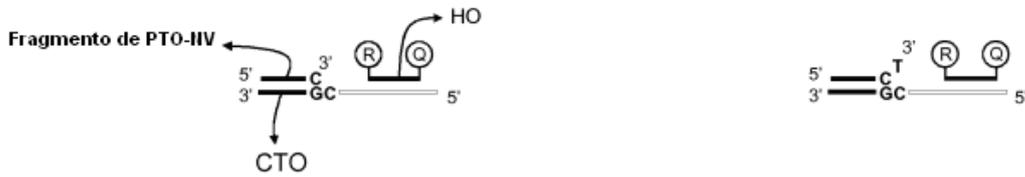
**A. Hibridación**



**B. Extensión del cebador y Escisión de PTO-NV**



**C. Hibridación de fragmento de PTO-NV y HO a CTO**



**D. Extensión de fragmento de PTO-NV y escisión de HO y Detección**



**Fig. 8A**

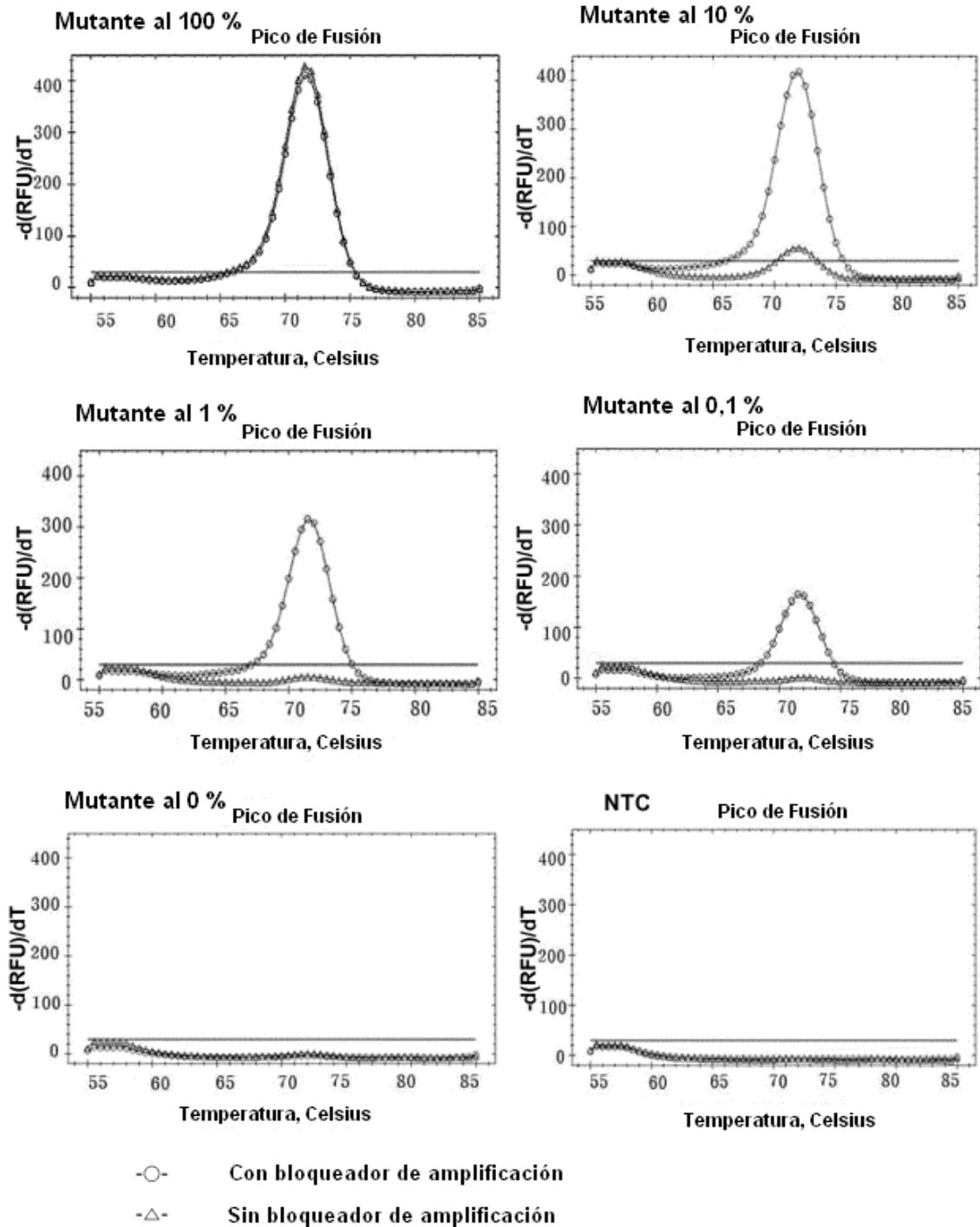


Fig. 8B

Bloqueador de amplificación <sup>1)</sup>	ADH de tipo silvestre (ng)	ADH mutante (ng)	Proporción de mutante <sup>2)</sup> (%)	T <sub>m</sub> <sup>4)</sup> (°C)	-d(RFU)/dT <sup>5)</sup>
+	0	100	100	71,5	411,3
-	0	100	100	71,5	428,8
+	90	10	10	71,5	417,5
-	90	10	10	71,5	56,6
+	99	1	1	71,5	315,5
-	99	1	1	-	-
+	99,9	0,1	0,1	71,5	164,1
-	99,9	0,1	0,1	-	-
+	100	0	0	-	-
-	100	0	0	-	-
+	0	0	NTC <sup>3)</sup>	-	-
-	0	0	NTC <sup>3)</sup>	-	-

1) El bloqueador de amplificación comprende LNA. Su sitio de diferenciación de variación de nucleótido tiene una secuencia de nucleótidos complementaria a la del ADN de tipo silvestre.

2) La proporción de mutante representa las proporciones de un ADN genómico humano de BRAF (V600E) mutante y de tipo silvestre en mezclas de muestra.

3) NTC representa Sin Control de Molde.

4) T<sub>m</sub> representa la temperatura de fusión del híbrido extendido formado en el ensayo de VD-PTOCE.

5) RFU representa unidades de fluorescencia relativa.

Fig. 9A

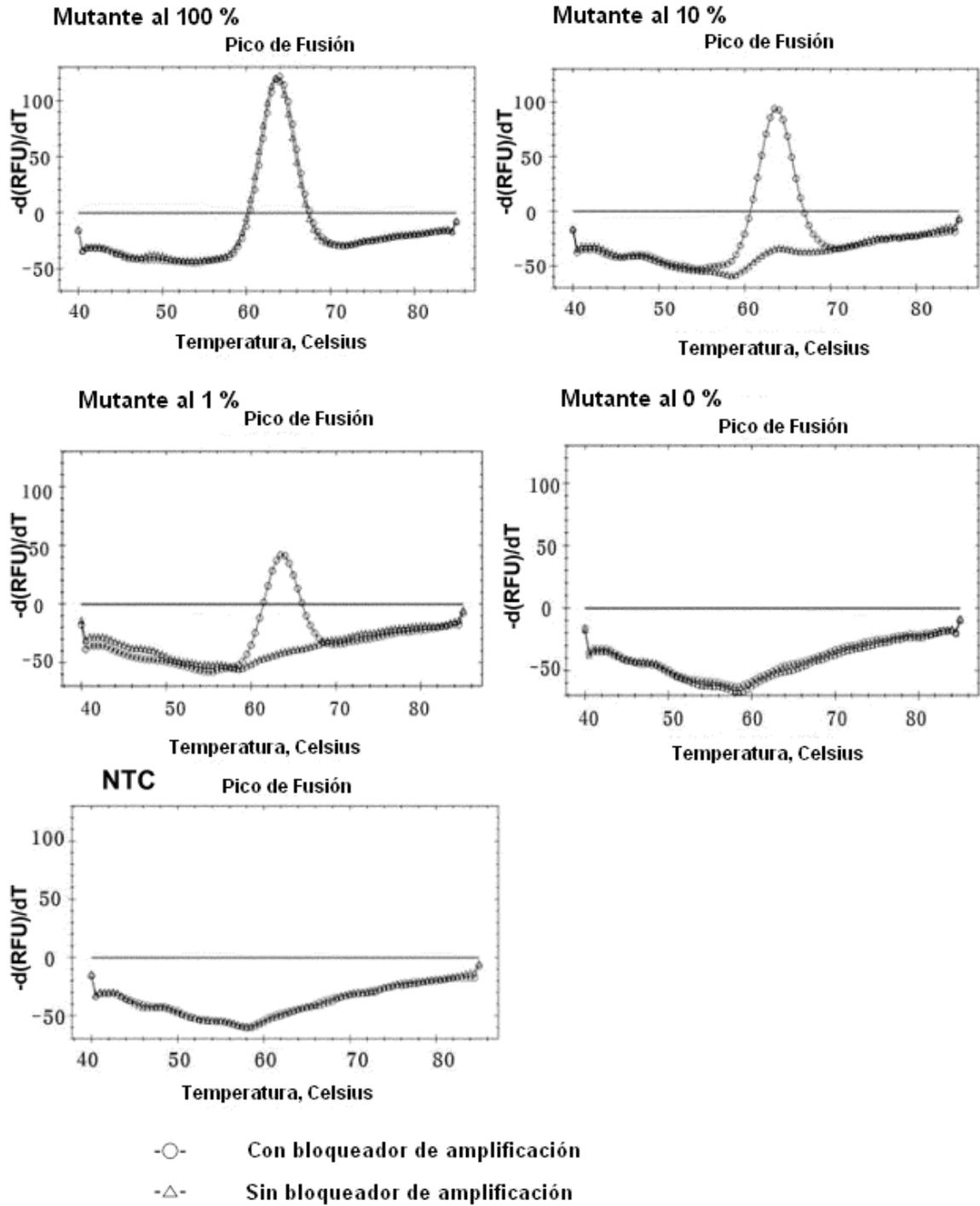


Fig. 9B

Bloqueador de amplificación <sup>1)</sup>	ADH de tipo silvestre (ng)	ADH mutante (ng)	Proporción de mutante <sup>2)</sup> (%)	Tm <sup>4)</sup> (°C)	-d(RFU)/dT <sup>5)</sup>
+	0	100	100	63,5	121,3
-	0	100	100	63,5	120,0
+	90	10	10	63,5	93,4
-	90	10	10	-	-
+	99	1	1	63,5	41,6
-	99	1	1	-	-
+	100	0	0	-	-
-	100	0	0	-	-
+	0	0	NTC <sup>3)</sup>	-	-
-	0	0	NTC <sup>3)</sup>	-	-

- 1) El bloqueador de amplificación comprende LNA. Su sitio de diferenciación de variación de nucleótido tiene una secuencia de nucleótidos complementaria a la del ADN de tipo silvestre.
- 2) La proporción de mutante representa las proporciones de un ADN genómico humano de BRAF (V600E) mutante y de tipo silvestre en mezclas de muestra.
- 3) NTC representa Sin Control de Molde.
- 4) Tm representa la temperatura de fusión de la hebra extendida/ácido nucleico bicatenario de 50 formado en el ensayo deVD-PTOCE usando 50.
- 5) RFU representa unidades de fluorescencia relativa.

Fig. 10A

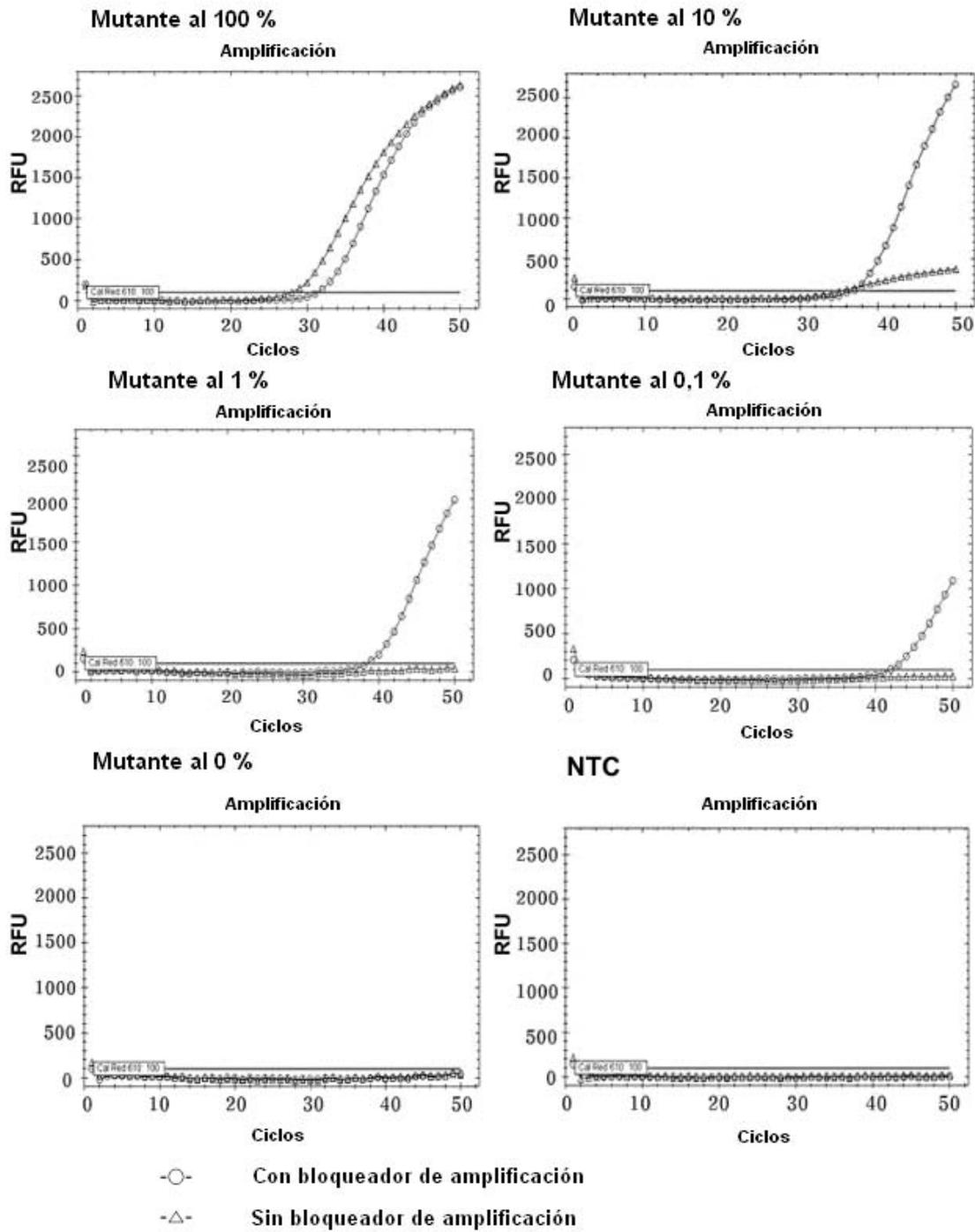


Fig. 10B

Bloqueador de amplificación <sup>1)</sup>	ADN de tipo silvestre (ng)	ADN mutante (ng)	Proporción de mutante <sup>2)</sup> (%)	C <sub>T</sub>
+	0	100	100	31,4
-	0	100	100	28,0
+	90	10	10	36,8
-	90	10	10	35,5
+	99	1	1	38,5
-	99	1	1	-
+	99,9	0,1	0,1	42,0
-	99,9	0,1	0,1	-
+	100	0	0	-
-	100	0	0	-
+	0	0	NTC <sup>3)</sup>	-
-	0	0	NTC <sup>3)</sup>	-

- 1) El bloqueador de amplificación comprende LNA. Su sitio de diferenciación de variación de nucleótido tiene una secuencia de nucleótidos complementaria a la del ADN de tipo silvestre.
- 2) La proporción de mutante representa las proporciones de un ADN genómico humano de BRAF (V600E) mutante y de tipo silvestre en mezclas de muestra.
- 3) NTC representa Sin Control de Diana.