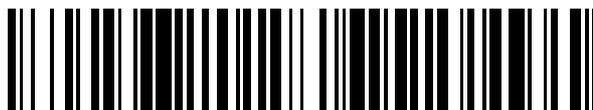


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 521 740**

51 Int. Cl.:

C12Q 1/68 (2006.01)

C12N 9/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **06.07.2010 E 10797720 (9)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **21.05.2014 EP 2451980**

54 Título: **Cofactores, dadores y aceptores de ligasa modificados químicamente**

30 Prioridad:

06.07.2009 US 223364 P

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

13.11.2014

73 Titular/es:

**TRILINK BIOTECHNOLOGIES (100.0%)
9955 Mesa Rim Road
San Diego, CA 92121, US**

72 Inventor/es:

**PAUL, NATASHA;
SHUM, JONATHAN;
LEBEDEV, ALEXANDRE y
ZON, GERALD**

74 Agente/Representante:

RIZZO, Sergio

ES 2 521 740 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

Cofactores, dadores y aceptores de ligasa modificados químicamente

REFERENCIA CRUZADA CON LA APLICACIÓN RELACIONADA

5 [0001] Esta aplicación de patente reivindica prioridad sobre la publicación estadounidense Num. 2011/0008788, titulada "Chemically Modified Ligasa Cofactors, Donors and Acceptors", presentada el 6 de julio de 2009.

DECLARACIÓN DE APOYO GUBERNAMENTAL

[0002] El gobierno de los Estados Unidos tiene ciertos derechos sobre la presente invención de conformidad con la Subvención Núm. GM085860 concedida por el Instituto Nacional de Ciencia Médica General.

CAMPO DE LA INVENCION

10 [0003] Se proporcionan aquí métodos y composiciones para ligar ácidos nucleicos. En aspectos y modos de realización particulares, los métodos y composiciones mejoran la especificidad de ligasa entre los ácidos nucleicos diana emparejados y los mal emparejados y/o reducen o inhiben la ligadura independiente del molde utilizando cofactores, dadores y aceptores de ligasa modificados y combinaciones de los mismos.

ANTECEDENTES DE LA INVENCION

15 [0004] Se proporciona la siguiente descripción para ayudar al entendimiento del lector. Ninguna información proporcionada o ninguna referencia citada se admiten como técnica anterior a la presente invención.

20 [0005] Las ligasas de ácido nucleico pertenecen a una clase de enzimas que catalizan la formación de enlace fosfodiéster entre los extremos adyacentes 3'-hidroxil y 5'-fosforil en ácido nucleico (p.ej., ARN o ADN) en presencia de un cofactor, como ATP o NAD⁺. Las ligasas se emplean en un número de aplicaciones de biología molecular incluyendo la detección de secuencia de ácido nucleico, detección de polimorfismo de nucleótido simple (SNP), detección de proteína, secuenciación por ligadura y reacción en cadena de ligasa (LCR).

25 [0006] En experimentos de fidelidad bioquímica, se ha descubierto que las ADNligasas toleran una variedad de malos emparejamientos del sustrato de ácido nucleico. Por ejemplo, T4 ADNligasa tiene una tolerancia de malos emparejamientos que resulta en una propensión para sellar una de cada 10³ dobles hélices mal emparejadas. Showalter, A. K., et al., 106 Chem. Rev, 340-360 (2006). En comparación, la tasa de error de una ADNpolimerasa convencional es aproximadamente un error por cada 10⁵-10⁶ inserciones dNTP, varios órdenes de magnitud más altos en fidelidad que la ligasa. Otras reacciones de enlace atípicas de la ADNligasa incluyen la formación de enlaces intermoleculares (Western, L., et al., 19 Nucleic Acids Res, 809-813 (1991)), uniones de dobles hélices de extremo no afilado que no se solapan (Barringer, K., et al., 89 Gene, 117-122 (1990), Cao, W., 22 Trends Biotechnol., 38-44 (2004)) y reacciones independientes a el molde (Barringer, K., et al., Kuhn, H., et al., 272 FEBS J, 5991-6000 (2005)).

35 [0007] Se han descrito varios enfoques para mejorar la fidelidad de ADN ligadura. Por ejemplo, Luo, J., et al., 24 Nucleic Acids Res, 3079-3085 (1996) publica modificar el tercer nucleótido anterior a partir de 3'-OH, un aceptor con base universal 3-nitropirrol y una mutagénesis dirigida al sitio de la proteína ligasa. Tong, J., et al., 27 Nucleic Acids Res, 788-794 (1999); Feng, H., et al., 43 Biochemistry, 12648-12659 (2004); Jeon, H., et al., 237 FEMS Microbiol Lett., 111-118 (2004); Lim, J., et al., 388 Arch Biochem Biophys., 253-260 (2001); y Luo, J., et al., 24 Nucleic Acids Res, 3071-3078 (1996) publican residuos de amino ácido mutando en la ADNligasa. Cao, W., 22 Trends Biotechnol., 38-44 (2004) publica utilizar una endonucleasa en la reacción de ligadura. Egholm, M., et al., Patente Estadounidense Núm. 6,297,016 publica modificaciones de aceptor. Fung, S., et al., Patente Estadounidense Núm. 5,593,826 publica sondas de aceptor substituido 3'-NH₂. Bandaru, R., et al., patentes estadounidenses nums. 6,811,986 y 6,635,425 publican el uso de 5'-tiofosfatos en la hebra del dador (5'-fosfato).

45 [0008] Los cofactores de ligasa modificados se han utilizado para determinar la dependencia del cofactor de ligasa y como inhibidores de ligadura. Véase p.ej., Montecucco, A., et al., 271 Biochem J., 265-268 (1990); Shuman, S., 34 Biochemistry, 16138-16147 (1995); Raae, A., et al., 81 Biochem. Biophys. Res. Commun., 24-27 (1978); Cherepanov, A.V., et al., 269 Eur. J. Biochem., 5993-5999 (2002); Belford, H.G., et al., 268 J Biol Chem, 2444-2450 (1993); Doherty, A.J., et al., 271 J Biol Chem, 11083-11089 (1996); Ho, C.K., et al., 71 J Virol, 1931-1937 (1997); Lai, X., et al., 6

[0009] M. Zirvi et al. (*Nucleic Acid Research* 27:e41-47, 1999) estudió la fidelidad de las ligasas termoestables para la detección de secuencia repetida de microsatélite utilizando secuencias de oligonucleótido que contienen análogos a las bases nitrogenadas.

5 **[0010]** J. Luo et al. (*Nucleic Acid Research* 24:3071-3078, 1996) publica el desarrollo de un ensayo cuantitativo para medir la fidelidad de la Tth ADN ligasa utilizando sustratos marcados con fluorescentes. Esta investigación descubrió que la enzima muestra una discriminación mayor contra todos los malos emparejamientos de base única del lado 3' de la mella en comparación con aquellas del lado 5' de la mella. La investigación destacó que la fidelidad de la enzima podría ser mejorada adicionalmente introduciendo una base mal emparejada o un análogo a la base nitrogenada universal (Q) en la tercera posición del oligonucleótido discriminante.

10 **[0011]** Zirvi *et al.* y Luo *et al.* demuestran mejoras en la fidelidad de ADNligasa que son, en el mejor de los casos, 100 veces mejores (desde 4.5×10^2 hasta $4,2 \times 10^4$) según se describe en Luo *et al.*, indicando que no existe espacio para que la mejora alcance la fidelidad de las ADN polimerasas.

15 **[0012]** Shuman (*Biochemistry* 34(49): 16138-16147, 1995) publica la especificidad, fidelidad e inhibición de la ADN ligasa *vaccinia virus*. Esta investigación descubrió que la vacuna ligasa catalizaba la hebra eficiente uniendo el ADN con mellas (rupturas del enlace entre dos nucleótidos vecinos) en presencia de magnesio y ATP. *Extremophiles*, 469-477 (2002); y *Skiranda, V., et al., 28 Nucleic Acids Res*, 2221-2228 (2000).

SUMARIO DE LA INVENCION

20 **[0013]** Aquí se proporcionan métodos y composiciones para la ligadura de ácido nucleico. Estos métodos incluyen el uso de ligasa de ácido nucleico, sustratos de ácido nucleico, cofactores, dadores o aceptores de ligasa, en reacciones de ligadura del ácido nucleico. En ciertos aspectos, los métodos se obtienen utilizando cofactores de ligasa modificados, dadores modificados, aceptores modificados o combinaciones de los mismos (denominados colectivamente aquí como "componentes de ligasa modificados"), que proporcionan una fidelidad mejorada en la ligadura de ácido nucleico. En modos de realización preferidos, los cofactores de ligasa modificados son ATP modificado y NAD⁺ modificado.

25 **[0014]** De acuerdo con un aspecto, se proporcionan métodos para detectar una mutación en un ácido nucleico diana. En ciertos modos de realización de los aspectos aquí proporcionados, el método incluye incubar el ácido nucleico diana en una mezcla de reacción que incluye una ligasa de ácido nucleico dependiente de un cofactor, un cofactor de ligasa, un polinucleótido dador y un polinucleótido aceptor, donde uno o más de entre el cofactor de ligasa, polinucleótido dador y polinucleótido aceptor están modificados; y para supervisar la ligadura de los polinucleótidos dador y aceptor, donde la cantidad de ligadura es indicativa de la presencia o ausencia de la mutación.

35 **[0015]** En un segundo aspecto, se proporcionan métodos para detectar la presencia o ausencia de una de las bases alternativas en un sitio de polimorfismo de un único nucleótido (SNP) en un ácido nucleico diana. En ciertos modos de realización de los aspectos aquí proporcionados, el método incluye incubar el ácido nucleico diana en una mezcla de reacción que incluye una ligasa ácido nucleico dependiente del cofactor, un cofactor de ligasa, un polinucleótido dador y un polinucleótido aceptor, donde uno o más de entre el cofactor de ligasa, el polinucleótido dador y el polinucleótido aceptor están modificados; y para supervisar la ligadura de los polinucleótidos dador y aceptor, donde la cantidad de ligadura indica la presencia o ausencia de una de las bases alternativas en el polimorfismo de un único nucleótido (SNP) en el ácido nucleico diana.

40 **[0016]** En un tercer aspecto, se proporcionan métodos para distinguir la presencia de una primera secuencia de ácido nucleico o de una segunda secuencia de ácido nucleico en un ácido nucleico diana. En ciertos modos de realización de los aspectos aquí proporcionados, los métodos incluyen incubar el ácido nucleico diana en una mezcla de reacción incluyendo una ligasa ácido nucleico dependiente del cofactor, un cofactor ligasa, un polinucleótido dador y un polinucleótido aceptor, donde uno o más de entre el cofactor de ligasa, el polinucleótido dador y el polinucleótido aceptor están modificados; y para supervisar la ligadura de los polinucleótidos dador y aceptor, donde la presencia o cantidad de ácido nucleico ligado es indicativa de la presencia o cantidad de la primera secuencia de ácido nucleico en el ácido nucleico diana y/o la ausencia de la segunda secuencia de ácido nucleico en el ácido nucleico diana; y la ausencia de ligadura es indicativa de la ausencia de la primera secuencia de ácido nucleico en el ácido nucleico diana.

50 **[0017]** En un cuarto aspecto, se proporcionan métodos que determinan la presencia o ausencia de un nucleótido particular en una posición específica de un ácido nucleico diana. En ciertos modos de realización de los aspectos aquí proporcionados, los métodos incluyen incubar el ácido nucleico diana en una mezcla de reacción que incluye una ligasa de ácido nucleico dependiente del cofactor, un cofactor ligasa, un polinucleótido dador y un polinucleótido aceptor, donde uno o más de entre el cofactor de ligasa, el polinucleótido dador y el polinucleótido

dador están modificados; y supervisar la ligadura de los polinucleótidos dador y aceptor, donde la presencia de un ácido nucleico ligado es indicativa de la presencia del nucleótido particular en la posición especificada del ácido nucleico diana y la ausencia de ligadura es indicativa de la ausencia del nucleótido particular en la posición especificada del ácido nucleico diana.

5 **[0018]** En un quinto aspecto, se proporcionan kits que incluyen las composiciones proporcionadas aquí y kits para llevar a cabo los métodos aquí proporcionados. También se proporcionan los kits que incluyen componentes de ligadura modificados para llevar a cabo la ligadura según se describe aquí. Por ejemplo, los kits pueden contener enzima ligasa y cofactores modificados para detectar dianas de ácido nucleico comunes como productos de alelo específico. El kit que contiene un componente de ligadura modificado puede incluir un
10 recipiente marcado para la ligadura de ácido nucleico, instrucciones para elaborar la ligadura de ácido nucleico y/o uno o más reactivos seleccionados del grupo que consiste en un cofactor modificado, ligasa de ácido nucleico y un tampón de reacción. El kit que contiene un componente de ligadura modificado también puede incluir uno o más polinucleótidos dador y aceptor. En un modo de realización, los polinucleótidos dador y aceptor modificados se modifican. Los kits pueden incluir un recipiente marcado para la ligadura de ácido nucleico,
15 instrucciones para realizar la ligadura de ácido nucleico y al menos un componente de ligadura modificada y/o uno o más reactivos seleccionados del grupo que consiste en un cofactor de ligasa, una ligasa de ácido nucleico, magnesio, secuencia de dador, secuencia de aceptor y tampón de reacción.

[0019] En un sexto aspecto, también se proporcionan aquí los métodos para identificar los componentes de ligadura modificados para elaborar la ligadura según se describe aquí. En algunos modos de realización, los
20 métodos identifican un cofactor modificado que ha aumentado la especificidad relativa al componente de ligadura natural u otros componentes de ligadura modificados. Por ejemplo, los métodos pueden evaluar la realización de un cofactor modificado en la presencia de un molde emparejada o mal emparejada. En algunos modos de realización, la región mal emparejada hibridará en la sonda de dador y en otros modos de realización, la región mal emparejada hibridará en la sonda de aceptor. En algunos modos de realización la elaboración de un cofactor modificado será evaluada para la reducción o inhibición de la actividad de ligadura en ausencia de un molde de
25 ácido nucleico. En algunos modos de realización, los métodos identifican un componente de ligadura modificado que ha mejorado la especificidad de ligadura relativa al cofactor natural o sin modificar. En algunos modos de realización, los métodos permiten la identificación de un componente de ligadura modificado cuyo uso proporciona una velocidad de ligadura similar relativa al cofactor natural o sin modificar para un ácido nucleico emparejado. En otros modos de realización, los métodos permiten la identificación de un componente de ligadura modificado que ha mejorado la especificidad de ligadura en presencia de un ácido nucleico mal emparejado relativo al cofactor natural o sin modificar. En otros modos de realización adicionales, los métodos evalúan un
30 componente de ligadura modificado para la producción o cantidad de ligadura donde existe uno o más pares de bases mal emparejados en el enlace de ligadura o entre 10 bases del enlace de ligadura. En modos de realización adicionales, los métodos evalúan un componente de ligadura modificado para la habilidad de reducir o inhibir la ligadura en ausencia de un molde de ácido nucleico.
35

[0020] En un séptimo aspecto, se proporcionan métodos para reducir o inhibir la ligadura en ausencia de un ácido nucleico diana. En ciertos modos de realización de los aspectos aquí proporcionados, el método incluye
40 incubar el ácido nucleico diana en una mezcla de reacción incluyendo una ligasa de ácido nucleico dependiente de un cofactor, un cofactor ligasa, un polinucleótido dador y un polinucleótido aceptor, donde uno o más de entre el cofactor de ligasa, el polinucleótido dador y el polinucleótido aceptor están modificados, donde la presencia del componente de ligadura modificado inhibe o reduce la ligadura en ausencia del ácido nucleico diana.

[0021] En algunos modos de realización de las composiciones y métodos aquí proporcionados se incluyen componentes de ligadura modificada, particularmente cofactor de ligasa modificado, aceptor modificado, dadores
45 modificados y combinaciones de los mismos. En modos de realización particulares, los componentes de ligadura modificados incluyen aquellos según se muestra en las Fórmulas I-III descritas aquí con más detalle.

[0022] Los componentes de ligadura modificada de los métodos y composiciones proporcionadas aquí tienen ventajas significativas. Por ejemplo, un usuario final puede utilizar los mismos protocolos de ligadura o similares y métodos ya en uso con cofactores modificados/naturales (es decir, ATP y NAD+), sondas de dador sin modificar
50 o sondas de aceptor sin modificar. Los componentes de ligadura modificados de los métodos y composiciones aquí proporcionadas son compatibles con los sistemas de ligadura y reactivos existentes; no se necesitan enzimas ni reactivos adicionales pero pueden utilizarse.

[0023] Los componentes de ligadura modificados de los métodos y composiciones aquí proporcionados preferiblemente tienen al menos aproximadamente la misma eficacia para la ligadura de ácido nucleico en
55 presencia de un objetivo complementario en comparación con el componente de ligadura sin modificar. Preferiblemente, la ligadura en presencia de ácido nucleico diana complementario o mal emparejado se considera deteriorada cuando un componente de ligadura modificado es al menos un 50% menos eficaz que un reactivo en una reacción de ligadura comparado con su componente correspondiente de ligadura sin modificar,

preferiblemente al menos un 60% menos eficaz, preferiblemente al menos un 70% menos eficaz, más preferiblemente al menos un 80% menos eficaz, más preferiblemente al menos un 90% menos eficaz, más preferiblemente al menos un 95% menos eficaz, más preferiblemente al menos un 99% menos eficaz y lo más preferiblemente un 100% menos eficaz como reactivo en una reacción de ligadura que su componente correspondiente de ligadura sin modificar. Alguien con un conocimiento general de la técnica es capaz de determinar fácilmente el nivel de actividad y eficacia de ligadura del componente de ligadura modificado.

[0024] Los componentes de ligadura modificados de los métodos y composiciones aquí proporcionados preferiblemente no tienen, o tienen reducida, eficacia para la ligadura de ácido nucleico en presencia de una diana mal emparejada en comparación con el componente de ligadura sin modificar.

[0025] Según se utiliza aquí, la expresión “cofactor ligasa” hace referencia a un compuesto químico que interactúa con una ligasa para que el ϵ -amino grupo de lisina de la ligasa ataque el fosfato alfa (es decir, el fosfato directamente unido al 5' oxígeno del componente de adenosina) del cofactor (p.ej., ATP o NAD⁺) para formar un enlace covalente de fosforamido (p.ej., según se muestra en la Fig.1). En ciertos modos de realización, el cofactor de ligasa es ATP, NAD⁺ o GTP. Generalmente las ligasas dependen de ATP o de NAD⁺.

[0026] Según se utiliza aquí, la expresión “cofactor de ligasa modificado” hace referencia a un cofactor de ligasa con un grupo de sustitución unido. En modos de realización preferidos, el cofactor de ligasa modificado es ATP modificado o NAD⁺ modificado. En algunos modos de realización, un cofactor de ligasa modificado tiene más de un grupo de sustitución. Los cofactores modificados incluyen aquellos mostrados aquí, por ejemplo, en la Fórmula I. En ciertos modos de realización, el cofactor de ligasa modificado no es ATP- α S (es decir, 5'- α -thio adenosín trifosfato), ATP- γ S (es decir, 5'-[γ -tio]-trifosfato) ni AMP-PNP (es decir, 5'-[β , γ -imido]-trifosfato).

[0027] Según se utiliza aquí, la expresión “cofactor de ligasa sin modificar” o “cofactor de ligasa natural” en relación con un “cofactor de ligasa modificado” hace referencia al cofactor de ligasa correspondiente sin el grupo de sustitución. Por ejemplo, un cofactor de ligasa sin modificar relativo al ATP modificado es ATP.

[0028] Según se utiliza aquí, la expresión “dador”, “polinucleótido dador”, “polinucleótido dador 5'-fosforilado” o “sonda dador” hace referencia a un polinucleótido con un 5' fosfato capaz de ser ligado a un aceptor. Un dador puede ser adecuado para la ligadura cuando se hibrida muy cerca de un aceptor o de un ácido nucleico diana complementario en condiciones adecuadas para una ligadura de ácido nucleico; preferiblemente un aceptor y un dador hibridan adyacentes el uno al otro en un ácido nucleico diana complementario. En algunos modos de realización, un dador tiene al menos un sitio de ácido nucleico que no es complementario (mal emparejado) con un ácido nucleico diana. En modos de realización particulares, el mal emparejamiento se da en un nucleótido de interés (p.ej., sitio SNP). Los polinucleótidos alternativos adecuados adicionales para los métodos y composiciones aquí proporcionados incluyen, sin carácter limitativo, ribonucleótidos modificados, desoxirribonucleótidos modificados, oligonucleótidos en la cadena fosfato-azúcar modificados, análogos a nucleótidos y mezclas de los mismos. En modos de realización preferibles, el dador es un oligonucleótido. Según se utiliza aquí, la expresión “dador modificado”, “polinucleótido dador modificado” o “sonda dador modificado” hace referencia a un dador con un grupo de sustitución. Preferiblemente, el grupo de sustitución está muy cerca del enlace de ligadura (p.ej., 1, 2, 3, 4 o 5 nucleótidos posterior al enlace de ligadura). En modos de realización preferidos, el grupo de sustitución está en la posición 2' de la ribosa y/o uno o más fosfatos internucleótidos. En algunos modos de realización, un dador modificado tiene más de un grupo de sustitución. Los dadores modificados incluyen aquellos aquí descritos, por ejemplo, en la Fórmula III.

[0029] Según se utiliza aquí, la expresión “aceptor”, “polinucleótido aceptor”, “polinucleótido aceptor acabado en 3'-hidroxil” o “sonda aceptor” hace referencia a un polinucleótido con un grupo 3' OH capaz de ligarse a un dador. Un aceptor puede ser adecuado para la ligadura cuando hibrida muy cerca de un dador en un ácido nucleico diana complementario en condiciones adecuadas para la ligadura de ácido nucleico; preferiblemente un aceptor y un dador hibridan adyacentes el uno al otro sobre un ácido nucleico diana complementario. En algunos modos de realización, un aceptor tiene al menos un sitio de ácido nucleico que no es complementario (mal emparejado) al ácido nucleico diana. En modos de realización particulares, el mal emparejamiento es en un nucleótido de interés (p.ej., sitio SNP). Los polinucleótidos alternativos adecuados adicionales para los métodos y composiciones aquí proporcionados incluyen, sin carácter limitativo, ribonucleótidos modificados, desoxirribonucleótidos modificados, oligonucleótidos en la cadena fosfato-azúcar modificados, nucleótidos análogos y mezclas de los mismos. En modos de realización preferidos, el aceptor es un oligonucleótido. Según se utiliza aquí, la expresión “aceptor modificado”, “polinucleótido aceptor modificado” o “sonda aceptor modificado” hace referencia a un aceptor con un grupo de sustitución. Preferiblemente, el grupo de sustitución está muy cerca de la unión de ligadura (p.ej., 1, 2, 3, 4 o 5 nucleótidos hacia arriba de la unión de ligadura). En modos de realización preferidos, el grupo de sustitución está en la posición 2' de la ribosa y/o uno o más fosfatos internucleótidos. En algunos modos de realización, un aceptor modificado tiene más de un grupo de sustitución. Los aceptores modificados incluyen aquellos mostrados aquí, por ejemplo, en la Fórmula II.

[0030] Según se utiliza aquí, la expresión “grupo de sustitución” hace referencia a cualquier fracción química que pueda unirse a un cofactor, dador o aceptor de ligasa. El grupo de sustitución puede unirse en ubicaciones que incluyen pero no se limitan al fosfato, azúcar, trifosfato, fracción de base nucleotídica y enlace internucleótido. El grupo de sustitución puede ser un grupo de cualquier naturaleza compatible con el proceso de ligadura de ácido nucleico. El grupo de sustitución puede ser un grupo de cualquier naturaleza compatible con el proceso de ligadura de ácido nucleico. En modos de realización preferidos, el grupo de sustitución aumenta la especificidad o fidelidad de la ligadura de ácido nucleico (p.ej., la habilidad para ligar ácido nucleico complementario y no ligar, o reducir la ligadura de ácido nucleico no complementario) cuando se une a un cofactor ligasa, polinucleótido dador o polinucleótido aceptor. En modos de realización preferidos, el grupo de sustitución cuando se une a un cofactor ligasa, polinucleótido dador o polinucleótido aceptor reduce, inhibe o elimina la ligadura de ácido nucleico no complementario en comparación con la ligadura en ausencia del grupo de sustitución. En modos de realización preferidos, el grupo de sustitución cuando se une a un cofactor ligasa, polinucleótido dador o polinucleótido aceptor reduce, inhibe o elimina la ligadura de ácido nucleico no complementario en comparación con la ligadura de ácido nucleico complementario. En modos de realización preferidos, cuando el grupo de sustitución se une a un cofactor ligasa, polinucleótido dador o polinucleótido aceptor reduce, inhibe o elimina la ligadura en ausencia del molde. En un modo de realización, el grupo de sustitución puede incluir una marca detectable. Así, siguiendo la ligadura, un ácido nucleico marcado puede identificarse por tamaño, masa, afinidad de captura y/o color. Las marcas detectables incluyen, sin carácter limitativo, cromóforos, fracciones fluorescentes, enzimas, antígenos, metales pesados, sondas magnéticas, tintes, grupos fosforescentes, materiales radioactivos, fracciones quimioluminiscentes y fracciones que detectan la electroquímica. La marca detectable es preferiblemente un tinte fluorescente; una marca de captura de afinidad preferible es el biotín.

[0031] Según se utiliza aquí, la expresión “componentes de ligadura modificados” hace referencia a cofactores de ligasa modificados, aceptores modificados y dadores modificados hace referencia a cada componente de manera individual, colectiva o combinaciones de los mismos. Por ejemplo, los componentes de ligadura modificados pueden hacer referencia sólo a cofactores ligasa modificados; cofactores de ligasa modificados con un tipo de modificación; cofactores de ligasa modificados con más de un tipo de modificación; cofactores de ligasa modificados y dadores modificados; cofactores de ligasa modificados y aceptores modificados; o cofactores de ligasa modificados, aceptores de ligasa modificados y dadores de ligasa modificados.

[0032] Según se utiliza aquí, la expresión “ligadura” o “ligar” hace referencia a métodos conocidos en la técnica para unir polinucleótidos. La ligadura preferiblemente se refiere al enlace del extremo 3' de un polinucleótido aceptor con el extremo 5' de un polinucleótido dador. En algunos modos de realización, una mella en el doble ácido nucleico está ligada para formar un enlace de fosfodiéster o un enlace internucleótido equivalente, formando así una copia más larga complementaria de la secuencia molde de ácido nucleico. Un doble ácido nucleico con mella consiste en un oligonucleótido aceptor terminado en hidroxil 3' hibridado en un molde de ácido nucleico complementario, con un oligonucleótido dador fosforilado 5' hibridado inmediatamente hacia debajo de un oligonucleótido aceptor. La ligadura que incluye las composiciones y métodos proporcionados aquí puede emplear uno o más cofactores modificados, uno o más polinucleótidos dadores modificados y aceptores modificados con uniones de ácido nucleico ligasa. La ligadura de sondas dador y aceptor sobre un ácido nucleico diana pueden ocurrir con o sin la renovación de sondas ligadas. Preferiblemente, la ligadura ocurre con la renovación. Un molde de ácido nucleico puede ser ADN, ARN, ADNc, ANP, ANB y/o un molde de ácido nucleico modificado u cualquier combinación de los mismos. Mientras los métodos ejemplares descritos de aquí en adelante hacen referencia a la ligadura, existen numerosos métodos adicionales adecuados para los métodos y composiciones aquí proporcionados conocidos en la técnica para la ligadura enzimática de ácidos nucleicos. Según se utiliza aquí el término “enlace de ligadura” hace referencia a dos posiciones adyacentes de ácido nucleico a lo largo de un molde donde una sonda de dador y una sonda de aceptor están ligadas.

[0033] Según se utiliza aquí, la expresión “ligasa” o “ácido nucleico ligasa” hace referencia a una enzima que es capaz de ligar ácido nucleico. Preferiblemente una ligasa es capaz de ligar el extremo 3' de un polinucleótido aceptor al extremo 5' de un polinucleótido dador. En otros modos de realización, la doble hélice con mella puede contener ADN, ARN, ADNc, ANP, ANB y/u otros nucleósidos modificados, o cualquier combinación de los mismos. En algunos modos de realización, la ligasa es uno de los siguientes: bacteriófago T4 ADNligasa, *Escherichia coli* (*E. coli*) ADNligasa, *Aquifex aeolicus* ADNligasa, *Thermus aquaticus* (*Taq*) ADNligasa, 9^N™ ADNligasa, *Methanobacterium thermoautotrophicum* ARN ligasa, *Ferroplasma acidiphilum* ADNligasa, ADNligasa humano I, ADNligasa humano II, ADNligasa humano III, ADNligasa humano IV, *Vaccinia virus* ADNligasa, *Chlorella virus* ADNligasa, *Pyrococcus furiosus* ADNligasa, *Haloferax volcanii* ADNligasa, *Acidianus ambivalens* ADNligasa, *Archaeoglobus fulgidus* ADNligasa, *Aeropyrum pernix* ADNligasa, *Cenarcheon symbiosum* ADNligasa, *Haloarcula marismortui* ADNligasa, *Ferroplasma acidarmanus* ADNligasa, *Natronomonas pharaensis* ADNligasa, *Haloquadratum walsbyi* ADNligasa, *Halobacterium salinarum* ADNligasa, *Methanosarcina acetivorans* ADNligasa, *Methanosarcina barkeri* ADNligasa, *Methanococcoides burtonii* ADNligasa, *Methanospirillum hungatei* ADNligasa, *Methanocaldococcus jannaschii* ADNligasa, *Methanopyrus kandleri* ADNligasa, *Methanosarcina mazei* ADNligasa, *Methanococcus maripaludis* ADNligasa, *Methanosaeta thermophila* ADNligasa, *Methanosphaera stadtmanae* ADNligasa, *Methanothermobacter thermoautotrophicus* ADNligasa,

Nanoarchaeum equitans ADNligasa, *Pyrococcus abyssi* ADNligasa, *Pyrobaculum aerophilum* ADNligasa, *Pyrococcus horikoshii* ADNligasa, *Picrophilus torridus* ADNligasa, *Sulfolobus acidocaldarius* ADNligasa, *Sulfolobus shibatae* ADNligasa, *Sulfolobus solfataricus* ADNligasa, *Sulfolobus tokodaii* ADN ligasa, *Thermoplasma acidophilum* ADNligasa, *Thermococcus fumicolans* ADNligasa, *Thermococcus kodakarensis* ADNligasa, *Thermococcus sp.* NA1 ADNligasa, *Thermoplasma volcanium* ADNligasa, *Staphylococcus aureus* DNA ligasa, *Thermus scotoductus* NAD+-ADNligasa, T4 ARN ligasa, *Staphylococcus aureus* ADNligasa, *Methanobacterium thermoautotrophicum* ADNligasa, *Thermus* species AK16D ADNligasa, *Haemophilus influenzae* ADNligasa, *Thermus thermophilus* ADNligasa, bacteriófago T7 ADNligasa, *Haemophilus influenzae* ADNligasa, *Mycobacterium tuberculosis* ADNligasa, *Deinococcus radiodurans* ARN ligasa, *Methanobacterium thermoautotrophicum* ARN ligasa, *Rhodothermus marinus* ARN ligasa, *Trypanosoma brucei* ARN ligasa, bacteriófago T4 ARN ligasa 1, Ampligasa y bacteriófago T4 ARN ligasa 2.

[0034] Según se utiliza aquí, la expresión “supervisar la ligadura” hace referencia a detectar la presencia, detectar la ausencia y/o medir la cantidad de ácido nucleico. La ligadura puede supervisarse, por ejemplo, detectando y/o cuantificando la cantidad de productos de ligadura utilizando electroforesis en gel o una marca detectable (p.ej., colorante fluorescente o quimioluminiscente) o correlacionando la presencia y/o la cantidad de un producto o de un proceso subsecuente a la presencia y/o cantidad de producto de ligadura (p.ej., correlacionando directamente la presencia y/o cantidad de una amplificación posterior de productos ligados con la cantidad de producto de ligadura). Supervisar la ligadura también incluye cualquier método de evaluar el tamaño de los ácidos nucleicos para indicar si la ligadura ha ocurrido o no o para evaluar qué parte del ácido nucleico total presente en la muestra se ha ligado y qué parte no; dichos resultados pueden expresarse en términos de un porcentaje o una proporción. Supervisar la ligadura incluye cualquiera de los métodos aquí publicados así como métodos conocidos en la técnica.

[0035] Según se utiliza aquí, la expresión “ácido nucleico” hace referencia a un polinucleótido, un oligonucleótido o cualquier fragmento de los mismos, cualquier derivado de ribosa o de desoxirribosa y a moléculas que ocurren de manera natural o sintética que contienen residuos nucleótidos modificados y/o naturales y enlaces internucleotidos. Estas frases también hace referencia al ADN o al ARN de origen natural (p.ej., genómico) o sintético que puede ser de una hebra, de dos hebras, de tres hebras o de cuatro hebras y puede representar la hebra sentido o antisentido, o a cualquier material similar al ADN o al ARN. Un “equivalente al ARN”, con referencia a una secuencia, se compone de la misma secuencia lineal de nucleótidos que la secuencia de ADN de referencia con la excepción de que todas o la mayoría de sucesos de la timina de base nitrogenada se reemplaza con uracilo y la cadena de azúcar se compone de ribosa en lugar de 2'-desoxirribosa. Se proporcionan aquí cadenas de ácido nucleico alternativas adicionales para los métodos y composiciones proporcionados aquí que incluyen, sin carácter limitativo, fosforotioato, fosforoselenoato, alquil fosfotriester, aril fosfotriester, alquil fosfonato, aril fosfonato, ácidos nucleicos bloqueados (ANB) y ácidos nucleicos péptídicos (ANP) y fosfoboronato y combinaciones de los mismos. El ARN puede utilizarse en los métodos aquí descritos y/o puede convertirse en ADNc por transcripción inversa para su uso en los métodos aquí descritos.

[0036] Según se utiliza aquí, la expresión “polinucleótido” hace referencia a una cadena de ácido nucleico, normalmente de una única hebra, que puede ocurrir de forma natural o sintética. A lo largo de esta aplicación, los ácidos nucleicos se designan desde el extremo 5' hasta el extremo 3'. Los ácidos nucleicos estándar, p.ej., ADN y ARN, se sintetizan químicamente con frecuencia “del 3' al 5'”, es decir, mediante la adición de nucleótidos al extremo 5' de un ácido nucleico en crecimiento. Los polinucleótidos pueden incluir ADN, ARN, ANP, ANB, otros nucleósidos modificados, o combinaciones de los mismos. En algunos modos de realización, un polinucleótido es un oligonucleótido. Según se utiliza aquí, la expresión “nucleótido” hace referencia a una subunidad de un ácido nucleico que consiste en un grupo fosfato, un azúcar de 5 carbonos y una base nitrógena. El azúcar de 5' carbonos descubierto en el ARN es ribosa. En el ADN, el azúcar de 5 carbonos es deoxirribosa 2'. El término también incluye análogos de dichas subunidades.

[0037] Según se utiliza aquí, la expresión “oligonucleótido” hace referencia a un polinucleótido con una secuencia de entre aproximadamente 5 hasta aproximadamente 200 nucleótidos, más preferiblemente de entre aproximadamente 10 hasta aproximadamente 100 nucleótidos, más preferiblemente de entre aproximadamente 10 hasta aproximadamente 70 nucleótidos, más preferiblemente de entre aproximadamente 10 hasta aproximadamente 50 nucleótidos, más preferiblemente de entre aproximadamente 10 hasta aproximadamente 30 nucleótidos, o más preferiblemente de entre aproximadamente 15 hasta aproximadamente 25 nucleótidos. En algunos modos de realización, un oligonucleótido incluye una secuencia de al menos 5 nucleótidos, al menos 10 nucleótidos, al menos 15 nucleótidos, al menos 20 nucleótidos, al menos 25 nucleótidos, al menos 30 nucleótidos, al menos 35 nucleótidos, al menos 40 nucleótidos, al menos 45 nucleótidos, al menos 50 nucleótidos, al menos 55 nucleótidos, al menos 60 nucleótidos, al menos 65 nucleótidos, al menos 70 nucleótidos en longitud, al menos 75 nucleótidos, al menos 80 nucleótidos en longitud, al menos 90 nucleótidos en longitud, al menos 100 nucleótidos en longitud, al menos 200 nucleótidos en longitud; o menos de 200 nucleótidos, menos de 150 nucleótidos, menos de 100 nucleótidos, menos de 90 nucleótidos, menos de 80 nucleótidos, menos de 70 nucleótidos, menos de 65 nucleótidos, menos de 60 nucleótidos, menos de 55

nucleótidos, menos de 50 nucleótidos, menos de 45 nucleótidos, menos de 40 nucleótidos, menos de 35 nucleótidos, menos de 30 nucleótidos, menos de 25 nucleótidos, menos de 20 nucleótidos, menos de 15 nucleótidos o combinaciones de los mismos, en longitud. En ciertos modos de realización, un oligonucleótido es 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11 o 12 nucleótidos en longitud.

5 **[0038]** Según se utiliza aquí, la expresión “cebador” u “oligonucleótido cebador” hace referencia a un polinucleótido o un oligonucleótido adecuado para cebar una reacción de extensión de ácido nucleico basada en enzima, p.ej., amplificación y ligadura. El artesano especializado es capaz de diseñar y preparar cebadores que son apropiados para la extensión de una secuencia objetivo. La longitud de los cebadores para su uso en los métodos y composiciones aquí proporcionados depende de varios factores incluyendo la identidad de secuencia nucleótida y la temperatura a la que estos ácidos nucleicos hibridan o se usan durante la extensión de ácido nucleico in vitro. Las consideraciones necesarias para determinar una longitud preferida para el cebador de una identidad de secuencia particular son conocidas por aquellos con un conocimiento general de la técnica. Por ejemplo, la longitud de un ácido nucleico u oligonucleótido corto puede relacionarse con su especificidad o selectividad de hibridación. Según se utiliza aquí, la expresión “secuencia de unión al cebador” o “PBS” (por sus siglas en inglés) hace referencia a una región de ácido nucleico que específicamente se hibrida o recoce en un cebador específico.

[0039] Según se utiliza aquí, la expresión “sonda” o “sonda oligonucleótida” hace referencia a un polinucleótido o un oligonucleótido adecuado para detectar la presencia o ausencia de un ácido nucleico específico.

20 **[0040]** Según se utiliza aquí, la expresión “ácido nucleico diana” hace referencia a cualquier ácido nucleico de interés.

[0041] Según se utiliza aquí, la expresión “ácido nucleico molde” hace referencia a un ácido nucleico capaz de unirse a un dador y/o a un aceptor. Preferiblemente el ácido nucleico molde comprende un ácido nucleico diana.

25 **[0042]** Según se utiliza aquí, la expresión “mutación” hace referencia a una diferencia en una secuencia de una primera secuencia de ácido nucleico en comparación con una segunda secuencia de ácido nucleico. Por ejemplo, un mutación incluye una sustitución (como un polimorfismo de nucleótido simple), supresión, inserción y translocación de ácido nucleico en una primera secuencia nucleica diana relativa a una segunda secuencia de ácido nucleico. Una segunda secuencia de ácido nucleico puede ser una secuencia de tipo silvestre o la secuencia de un sitio mutado alternativo.

30 **[0043]** Según se utiliza aquí, la expresión “mal emparejamiento” hace referencia a nucleótidos o ácido nucleótido que no es complementario a un nucleótido o ácido nucleótido diana. Según se utiliza aquí, la expresión “molde de mal emparejamiento” o “molde mal emparejado” hace referencia a un ácido nucleico de doble hebra donde al menos un residuo base en cada hebra no está emparejado con ningún residuo, o emparejado con una base incorrecta, p.ej., A no emparejado con T o C no emparejado con G. Una reacción de ligadura con menos del 100% de fidelidad/especificidad forma un producto de ligadura mal emparejado. Según se utiliza aquí, la expresión “molde emparejado” hace referencia a un ácido nucleico donde todas las bases son complementarias a las sondas dador y aceptor.

40 **[0044]** Según se utiliza aquí, la expresión “polimorfismo de nucleótido simple” o “SNP” hace referencia a una variación de secuencia genética de base simple entre diferentes individuos de una especie u otra población específica. En algunos modos de realización, los SNP son posiciones de par de bases simple en un sitio de ácido nucleico específico en el ADN genómico en el que diferentes secuencias alternativas (alelos) existen en individuos normales en algunas poblaciones donde el alelo menos frecuente tiene una abundancia del 1% o mayor; o 0,8% o mayor; o 0,5% o mayor; o 0,4% o mayor; o 0,3% o mayor; o 0,2% o mayor; o 0,1% o mayor. En algunos modos de realización, un SNP de interés es conocido por alguien especialista en la técnica, por ejemplo, un SNP particular se publica en una revista científica, como aquellas accesibles a través de Pubmed (disponible en <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/>) como Science, Nature, PNAS y NEJM. En algunos modos de realización, un SNP puede encontrarse en una base de datos de polimorfismos como aquellas que se encuentran en Entrez SNP (disponible en <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/sites/entrez?db=snp>) o una base de datos de SNP humano (disponible en <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/projects/SNP/>). En algunos modos de realización, una población incluye a todos los humanos en conjunto o a un subconjunto de humanos, como un grupo de gente de una raza, nacionalidad, región geográfica, linaje de familia, religión, género o edad en particular o de un periodo de tiempo o era en particular.

[0045] Según se utiliza aquí, la expresión “sitio de polimorfismo de nucleótido simple”, “sitio SNP” o “posición SNP” hace referencia a una posición de ácido nucleico donde se sabe que ocurre un SNP.

55 **[0046]** Según se utiliza aquí, la expresión “extremo” con respecto a un polinucleótido (preferiblemente un oligonucleótido) hace referencia a los nucleótidos en el extremo 3' o 5' de un polinucleótido. Preferiblemente el

extremo de un polinucleótido incluye los nucleótidos de extremo 6, más preferiblemente los nucleótidos de extremo 5, más preferiblemente los nucleótidos de extremo 4, más preferiblemente los nucleótidos de extremo 3, más preferiblemente los nucleótidos de extremo 2, o más preferiblemente el nucleótido extremo.

5 **[0047]** Según se utiliza aquí, la expresión “marca” o “marca detectable” hace referencia a cualquier compuesto o combinación de compuestos que puede unirse o asociarse de otra manera con una molécula para que la molécula pueda detectarse directa o indirectamente detectando la marca. Una marca detectable puede ser un radioisótopo (p.ej., carbono, fósforo, yodo, indio, sulfuro, tritio, etc.), una masa de isótopo (p.ej., H², C¹³ o N¹⁵), un tinte o fluoróforo (p.ej., cianina, fluoresceína o rodamina), un hapteno (p.ej., biotín) o cualquier otro agente que pueda detectarse directa o indirectamente. Tras la incorporación de un NTP marcado en un amplicón u otro
10 producto de polimerización, puede detectarse la marca.

[0048] Según se utiliza aquí, la expresión “hibridar” o “hibridar específicamente” hace referencia a un proceso donde dos hebras de ácido nucleico complementario se recocen entre ellas bajo condiciones apropiadamente severas. Las hibridaciones de los ácidos nucleicos diana se conducen común y preferiblemente con moléculas de ácido nucleico de longitud de sonda, preferiblemente de 20 a 100 nucleótidos de longitud. Las técnicas de
15 hibridación de ácido nucleico son muy conocidas en el ámbito. Véase, p.ej., Sambrook, et al. “*Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, Second Edition, Cold Spring Harbor Press, Plainview, N.Y.(1989); Ausubel, F.M., et al., *Current Protocols in Molecular Biology*, John Wiley & Sons, Secaucus, N.J. (1994).

[0049] Según se utiliza aquí, la expresión “condiciones severas de hibridación” hace referencia a las condiciones de hibridación que no permiten la hibridación de dos ácidos nucleicos que no son totalmente complementarios.

20 **[0050]** Según se utiliza aquí, la expresión “muestra” o “prueba de muestra” hace referencia a cualquier líquido o material sólido que incluya el ácido nucleico de interés. Una prueba de muestra puede obtenerse a partir de cualquier fuente biológica (es decir, una muestra biológica), como las células en un cultivo o una muestra de tejido o sintéticamente producidas incluyendo un molde sintetizado de forma química.

[0051] Según se utiliza aquí, la expresión “complemento”, “complementario” o “complementariedad” en el contexto de un oligonucleótido o polinucleótido (es decir, una secuencia de nucleótidos como un cebador oligonucleótido o un ácido nucleico diana) hace referencia a las reglas estándar del par de bases Watson/Crick. Una secuencia
25 complemento también puede ser una secuencia de ADN o ARN complementario a la secuencia de ADN o su secuencia complemento y también puede ser ADNc. Por ejemplo, la secuencia “5'-A-G-T-C-3'” es complementaria a la secuencia “3'-T-C-A-G-5'”. Ciertos nucleótidos no descubiertos comúnmente en ácidos nucleótidos naturales o químicamente sintetizados pueden incluirse en los ácidos nucleicos aquí descritos; estos incluyen pero no se limitan a nucleósidos, nucleótidos y ácidos nucleicos modificados base y de azúcar, como la inosina, 7-deazaguanosina, 2'-O-metilguanosa, 2'-fluoro-2'-desoxicitidina, ácidos nucleicos bloqueados (ANB), y ácidos nucleicos peptídicos (ANP) y combinaciones de los mismos. La complementariedad no necesita ser perfecta; las dobles hélices estables pueden contener pares de bases mal emparejados, degenerativos, o
30 nucleótidos mal emparejados. Aquellos especialistas en la técnica de la tecnología de ácido nucleico pueden determinar la estabilidad de las dobles hélices de manera empírica considerando una cantidad de variables que incluyen, por ejemplo, la longitud del oligonucleótido, la composición y secuencia base del oligonucleótido, la incidencia de pares de bases mal emparejados, la fuerza iónica, otros componentes y condiciones del tampón de hibridación.

40 **[0052]** La complementariedad puede ser parcial ya que sólo algunas de las bases nucleótidas de dos hebras de ácido nucleico son emparejadas de acuerdo con las reglas de par de bases. La complementariedad puede ser completa o total donde todas las bases nucleótidas de dos hebras de ácido nucleico son emparejadas de acuerdo con las reglas de pares de bases. La complementariedad puede estar ausente donde ninguna de las bases nucleótidas de dos hebras de ácido nucleico son emparejadas de acuerdo con las reglas de pares de
45 bases. El grado de complementariedad entre las hebras de ácido nucleico tiene efectos significativos en la eficacia y dureza de hibridación entre hebras de ácido nucleico. Esto es de particular importancia en las reacciones de ligadura y amplificación, así como en métodos de detección que dependen de la ligadura entre los ácidos nucleicos. Los términos también pueden utilizarse en referencia a nucleótidos individuales, especialmente dentro del contexto de los polinucleótidos. Por ejemplo, un nucleótido particular dentro de un oligonucleótido puede
50 destacar por su complementariedad, o la falta de esta, con un nucleótido dentro de otra hebra de ácido nucleico, en contraste o comparación con la complementariedad entre el resto del oligonucleótido y la hebra de ácido nucleico.

[0053] Según se utiliza aquí, la expresión “sustancialmente complementario” hace referencia a dos secuencias que hibridan bajo condiciones casi severas de hibridación. La persona especializada entenderá que las
55 secuencias sustancialmente complementarias no necesitan hibridar a lo largo de toda su longitud. En particular, las secuencias sustancialmente complementarias comprenden una secuencia adyacente de bases que no hibrida

en una secuencia diana, situada en 3' o 5' con una secuencia adyacente de bases que hibrida bajo condiciones severas de hibridación en una secuencia diana.

5 **[0054]** Según se utiliza aquí, un polinucleótido, oligonucleótido, cebador o sonda es “específico” para un ácido nucleico si la secuencia de hibridación del cebador polinucleotido u oligonucleótido del un cebador polinucleotido u oligonucleótido tiene al menos un 50% de identidad de secuencia con una parte del ácido nucleico cuando el cebador polinucleótido u oligonucleótido y el ácido nucleico se alinean. Un cebador polinucleótido u oligonucleótido que es específico para un ácido nucleico es uno que, bajo la hibridación apropiada o condiciones de limpieza, es capaz de hibridar en la diana de interés y no hibrida sustancialmente en secuencias de ácidos nucleicos que no son de interés. Los niveles más altos de identidad de secuencia son preferidos e incluyen al
10 menos un 75%, al menos un 80%, al menos un 85%, al menos un 90%, al menos un 95%, al menos un 99% y más preferiblemente al menos un 100% de identidad de secuencia.

15 **[0055]** Según se utiliza aquí, la expresión “nucleósido” incluye todos los nucleósidos que ocurren de manera natural, incluyendo todas las formas de bases nucleósidas y furanosidos descubiertos en ácidos nucleicos naturales. Los anillos base más comúnmente descubiertos en nucleósidos que ocurren de manera natural son anillos de purina y de pirimidina. Los anillos de purina que ocurren naturalmente incluyen, por ejemplo, adenina, guanina y N⁶-metiladenina. Los anillos de pirimidina que ocurren de manera natural incluyen, por ejemplo, citosina, timina y 5-metilcitosina. Los nucleósidos que ocurren de manera natural por ejemplo incluyen, sin carácter limitativo, derivados de 2'-desoxirribo y rribo de adenosina, guanosina, citidina, timidina, uridina, inosina, 7-deaza-guanosina, 7-metilguanosina. Los nucleósidos que ocurren de manera natural también incluyen
20 modificaciones al azúcar ribosa, según se ve para 2'-O-metiluridina.

25 **[0056]** Según se utiliza aquí, los términos “análogos nucleósidos”, “nucleósidos modificados” o “derivados nucleósidos” incluyen nucleósidos sintéticos según se describen aquí. Los derivados nucleósidos también incluyen tener una base modificada y/o fracciones de azúcar, con o sin grupos de protección. Dichos análogos incluyen, por ejemplo, 2'-deoxi-2'-fluorouridina y similares. Los compuestos y métodos aquí proporcionados incluyen dichos anillos base y análogos sintéticos de los mismos, así como heterociclo no natural sustituido por azúcares base, e incluso acíclicos sustituidos por azúcares base. Además, los derivados nucleósidos incluyen otros derivados de purina y pirimidina, por ejemplo, purinas de halógeno sustituido (p.ej., 6-fluoropurina), pirimidinas de halógeno sustituido, N⁶-etiladenina, N⁴-(alquil)-citosinas, 5-etilcitosina y similares. Los derivados y análogos nucleósidos abarcan una amplia variedad de modificaciones, como aquellas descritas en la patente estadounidense núm. 6.762.298.
30

35 **[0057]** Según se utiliza aquí, los términos “base universal”, “base degenerada”, “base análoga universal” y “base análoga degenerada” incluyen, por ejemplo, un análogo con una base artificial que es preferiblemente reconocible mediante ácido nucleico ligasa como un sustituto para cualquier base nitrogenada específica de un nucleosido como dA, A, dT, dU, U, dC, C, dG, G y otras bases nitrogenadas específicas. Los nucleósidos que contienen bases universales o bases degeneradas también pueden utilizarse y pueden encontrarse ejemplos en Loakes, D., 29 *Nucleic Acids Res.* 2437-2447 (2001); Crey-Desbiolles, C., et. al., 33 *Nucleic Acids Res.* 1532-1543 (2005); Kincaid, K., et. al., 33 *Nucleic Acids Res.* 2620-2628

[0058] (2005); Preparata, FP, Oliver, JS, 11 *J. Comput. Biol.* 753-765 (2004); y Hill, F., et. al., 95 *Proc Natl Acad Sci Estados Unidos* 4258-4263 (1998).

40 **[0059]** Según se utilice aquí, el término “enlace entre nucleótidos” hace referencia al enlace o las uniones que conectan dos nucleósidos de un cebador oligonucleótido o ácido nucleico y puede ser un enlace de fosfodiéster natural o un enlace modificado.

[0060] Según se utiliza aquí, la expresión “acil” denota el grupo $-C(O)R^a$, donde R^a es hidrógeno, alquil inferior, cicloalquil, heterociclil, aril, heteroaril y similares.

45 **[0061]** Según se utiliza aquí, la expresión “acil sustituido” denota el grupo $-C(O)R^a$, donde R^a es alquil inferior sustituido, cicloalquil sustituido, heterociclil sustituido, aril sustituido, heteroaril sustituido y similares.

[0062] Según se utiliza aquí, la expresión “aciloxi” denota el grupo $-OC(O)R^b$, donde R^b es hidrógeno, alquil inferior, alquil inferior sustituido, cicloalquil, cicloalquil sustituido, heterociclil, heterociclil sustituido, aril, aril sustituido, heteroaril, heteroaril sustituido y similares.

50 **[0063]** Según se utiliza aquí, la expresión “alcano” hace referencia a un compuesto orgánico que incluye átomos de carbono y átomos de hidrógeno e incluye enlaces C-H y adicionalmente incluye enlaces únicos C-C en alcanos que no sean metano. El término “alcano” incluye alcanos de cadena lineal como alcanos que tienen de 1 a 20 átomos de carbono. En algunos modos de realización, los alcanos incluyen alcanos de cadena lineal como

alcanos que tienen de 1 a 8 átomos de carbono como el metano, etano, propano, butano, pentano, hexano, heptano y octano. El término "alcano" también incluye alcanos de cadena ramificada como por ejemplo, sin carácter limitativo, los alcanos de cadena ramificada que tienen de 1 a 20, y en algunos modos de realización de 1 a 8 átomos de carbono, como por ejemplo, sin carácter limitativo, 2-metilpropano, 2,2-dimetilpropano, 2-metilbutano, 2,3-dimetilbutano, 2,2-dimetilbutano, 2-metilpentano, 3-metilpentano, 2,3-dimetilpentano, 2,4-dimetilpentano, 2,2-dimetilpentano, 3,3-dimetilpentano, 2-metilhexano, 3-metilhexano, 2,2-dimetilhexano, 2,3-dimetilhexano, 2,4-dimetilhexano, 2,5-dimetilhexano, 3,3-dimetilhexano, 3,4-dimetilhexano, 2-metilheptano, 3-metilheptano, 4-metilheptano, 3-etilpentano, 3-etil-2-metilpentano, 3-etilhexano y similares. Un enlace C-C o C-H de un alcano puede reemplazarse con un enlace a otro grupo como un grupo hidroxilo, un halógeno como F, Cl, Br o I, un grupo sulfhidrilo, o un grupo amino. Los alcanos reemplazados por dichos grupos pueden llamarse respectivamente hidroxialcanos, haloalcanos como fluoroalcanos, cloroalcanos, bromoalcanos, yodoalcanos, mercaptoalcanos y aminoalcanos.

[0064] Según se utiliza aquí, la expresión "alqueniil" hace referencia a una cadena lineal o una cadena ramificada de hidrocarbilo, que tiene uno o más enlaces dobles y, a no ser que se especifique lo contrario, contiene entre 2 y aproximadamente 20 átomos de carbono, preferiblemente entre 2 y aproximadamente 10 átomos, más preferiblemente entre 2 y aproximadamente 8 átomos de carbono, y más preferiblemente entre 2 y 6 átomos de carbono. Los ejemplos de radicales de alqueniilo incluyen vinilo, alilo, 1-4-butadieniilo; isopropeniilo y similares.

[0065] Según se utiliza aquí, la expresión "alquenilarilo" hace referencia a alqueniilo sustituido con grupos arilo y "alquenilarilo sustituido" hace referencia a grupos de alquenilarilo que contienen además uno o más sustituyentes según se expone aquí.

[0066] Según se utiliza aquí, la expresión "alqueniileno" hace referencia a la cadena ramificada o lineal divalente de grupos hidrocarbilo con al menos un enlace doble carbono-carbono y típicamente conteniendo 2-20 átomos de carbono, preferiblemente 2-12 átomos de carbono, preferiblemente 2-8 átomos de carbono y el "alqueniileno sustituido" hace referencia a grupos alqueniileno que contienen además uno o más sustituyentes según se expone aquí.

[0067] Según se utiliza aquí, la expresión "alquil" hace referencia a una cadena de enlace única de hidrocarburos que oscilan comúnmente entre 1 y 20 átomos de carbono, preferiblemente entre 1 y 8 átomos de carbono, los ejemplos incluyen metil, etil, propil, isopropil, y similares. Los ejemplos de dichos radicales alquilo incluyen metil, etil, propil, isopropil, n-butil, sec-butil, isobutil, tert-butil, pentil, isoamil, hexil, octil, dodecanil y similares.

[0068] Según se utiliza aquí, la expresión "alquil inferior" hace referencia a una cadena lineal o a una cadena ramificada de hidrocarburos que oscilan normalmente entre 1 y 6 átomos de carbono, preferiblemente entre 2 y 5 átomos de carbono. Los ejemplos incluyen etil, propil, isopropil y similares.

[0069] Según se utiliza aquí, la expresión "alquilenilo" hace referencia a un hidrocarbilo divalente que contiene entre 1 y 20 átomos de carbono, preferiblemente entre 1 y 15 átomos de carbono, cadena lineal o ramificada, de los que dos átomos de hidrógeno se toman a partir del mismo átomo de carbono o de diferentes átomos de carbono. Los ejemplos de alquilenilo incluyen, sin carácter limitativo, metileno (-CH₂-), etileno (-CH₂CH₂-) y similares.

[0069] Según se utiliza aquí, la expresión "alquilenilo" hace referencia a un hidrocarbilo divalente conteniendo entre 1 y 20 átomos de carbono, preferiblemente entre 1 y 15 átomos de carbono, de cadena lineal o ramificada, de los que dos átomos de hidrógeno se toman del mismo átomo de carbono o de diferentes átomos de carbono. Los ejemplos de alquilenilo incluyen, sin carácter limitativo, metileno (-CH₂-), etileno (-CH₂CH₂-), y similares.

[0070] Según se utiliza aquí, la expresión "alquiniil" hace referencia a un hidrocarbilo de cadena lineal o de cadena ramificada, que tiene una o más uniones triples y contiene entre 2 y 20 átomos de carbono, preferiblemente entre 2 y 10 átomos de carbono, más preferiblemente entre 2 y 8 átomos de carbono y más preferiblemente entre 2 y 6 átomos de carbono. Los ejemplos de radicales de alquiniil incluyen etinil, propinil (propargil), butinil y similares.

[0071] Según se utiliza aquí, la expresión "alquiniilaril" hace referencia a alquiniil sustituido por grupos arilo y "alquiniilaril sustituido" hace referencia a grupos alquiniilaril que contiene además uno o más sustituyentes según se expone aquí.

[0072] Según se utiliza aquí, la expresión "alcoxi" designa al grupo -OR^c, donde R^c es un alquil inferior, alquil inferior sustituido, aril, aril sustituido, aralquil, aralquil sustituido, heteroalquil, heteroalquil, cicloalquil, cicloalquil sustituido, cicloheteroalquil, o cicloheteroalquil sustituido según se define.

- [0073]** Según se utiliza aquí, la expresión “alcoxi inferior” designa el grupo $-OR^d$, donde R^d es un alquil inferior.
- [0074]** Según se utiliza aquí, la expresión “alquilaril” hace referencia a alquil sustituido por grupos aril y “alquilaril sustituido” hace referencia a grupos alquilaril que contienen además uno o más sustituyentes según se expone aquí.
- 5 **[0075]** Según se utiliza aquí, la expresión “alquilcarbonilamino” designa el grupo $-NR^eC(O)R^f$, donde R^e es opcionalmente alquil sustituido y R^f es hidrógeno o alquil.
- [0076]** Según se utiliza aquí, la expresión “alquilsulfinil” designa el grupo $-S(O)R^g$, donde R^g es opcionalmente alquil sustituido.
- 10 **[0077]** Según se utiliza aquí, la expresión “alquilsulfonyl” designa el grupo $-S(O)_2R^g$, donde R^g es opcionalmente alquil sustituido.
- [0078]** Según se utiliza aquí, la expresión “alquilsulfonilamino” designa el grupo $-NR^eS(O)_2R^f$, donde R^e es opcionalmente alquil sustituido y R^f es hidrógeno o alquil.
- [0079]** Según se utiliza aquí, la expresión “alquiltio” hace referencia al grupo $-S-R^h$, donde R^h es alquil.
- 15 **[0080]** Según se utiliza aquí, la expresión “alquiltio sustituido” hace referencia al grupo $-S-R^i$, donde R^i es alquil sustituido.
- [0081]** Según se utiliza aquí, la expresión “alquinileno” hace referencia a grupos hidrocarbilo de cadena ramificada o lineal divalente con al menos un enlace triple carbono-carbono y típicamente tiene entre 2 y 12 átomos de carbono, preferiblemente aproximadamente entre 2 y 8 átomos de carbono y “alquinileno sustituido” hace referencia a grupos de alquinileno que contienen además uno o más sustituyentes según se expone aquí.
- 20 **[0082]** Según se utiliza aquí, la expresión “amido” designa el grupo $-C(O)NR^iR^j$, donde R^i y R^j pueden ser independientemente hidrógeno, alquil inferior, alquil inferior sustituido, alquil sustituido, aril, aril sustituido, heteroaril, o heteroaril sustituido.
- [0083]** Según se utiliza aquí, la expresión “amido sustituido” designa el grupo $-C(O)NR^kR^k'$, donde R^k y R^k' pueden ser independientemente hidrógeno, alquil inferior, alquil inferior sustituido, aril, aril sustituido, heteroaril o heteroaril sustituido, no obstante, siempre que, al menos uno de entre R^k y R^k' no sea hidrógeno. R^kR^k' en combinación con el nitrógeno puede formar opcionalmente un anillo heterocíclico o heteroaril sustituido.
- 25 **[0084]** Según se utiliza aquí, la expresión “amidino” designa el grupo $-C(=NR^m)NR^mR^m$, donde R^m , R^m y R^m son independientemente hidrógeno u opcionalmente alquil, aril o heteroaril sustituido.
- 30 **[0085]** Según se utiliza aquí, la expresión “amino” o “amina” designa el grupo $-NR^nR^n$, donde R^n y R^n pueden ser independientemente hidrógeno, alquil inferior, alquil inferior sustituido, alquil, alquil sustituido, aril, aril sustituido, heteroaril, o heteroaril sustituido según se define aquí. Una “amina divalente” designa el grupo $-NH-$. Una “amina divalente sustituida” designa el grupo $-NR-$ donde R es un alquil inferior, alquil inferior sustituido, alquil, alquil sustituido, aril, aril sustituido, heteroaril o heteroaril sustituido.
- 35 **[0086]** Según se utiliza aquí, la expresión “amino sustituido” o “amina sustituida” designa el grupo $-NR^pR^p$, donde R^p y R^p son independientemente hidrógeno, alquil inferior, alquil inferior sustituido, alquil, alquil sustituido, aril, aril sustituido, heteroaril, heteroaril sustituido, no obstante, siempre que al menos uno de entre R^p y R^p no sea hidrógeno. R^pR^p en combinación con el nitrógeno puede formar un anillo heteroaril o heterocíclico opcionalmente sustituido.
- 40 **[0087]** Según se utiliza aquí, la expresión “arilalquinil” hace referencia a grupos alquinil de aril sustituido y “arilalquinil sustituido” hace referencia a grupos arilalquinil que contienen además uno o más sustituyentes según se establece aquí.
- 45 **[0088]** Según se utiliza aquí, la expresión “aralquil” hace referencia al alquil según se define aquí, donde un átomo de hidrógeno alquilo se reemplaza por un arilo según se define aquí. Los ejemplos de radicales de aralquil incluyen benzil, fenetil, 1-fenilpropil, 2-fenilpropil, 3-fenilpropil, 1-naftilpropil, 2-naftilpropil, 3-naftilpropil, 3-naftilbutil y similares.

- [0089]** Según se utiliza aquí, la expresión “aroil” hace referencia a especies de aril-carbonil como benzoil y “aroil sustituido” hace referencia a grupos aroil que contienen además uno o más sustituyentes según se establece aquí.
- 5 **[0090]** Según se utiliza aquí, la expresión “arilalquil” hace referencia a aril sustituido por grupos alquilo y “arilalquil sustituido” hace referencia a grupos arilalquil que contienen además uno o más sustituyentes según se establece aquí.
- 10 **[0091]** Según se utiliza aquí, la expresión “aril” sólo o en combinación hace referencia a fenil, naftil o heterocíclico aromático fundido opcionalmente con un cicloalquil de preferiblemente 5-7, más preferiblemente 5-6 miembros de anillo y/u opcionalmente sustituido con entre 1 y 3 grupos de sustituyentes de halo, hidroxil, alcoxi, alquiltio, alquilsulfinil, alquilsulfonil, aciloxi, ariloxi, heteroariloxi, amino opcionalmente mono- or di-sustituido con grupos alquil, aril o heteroaril, amidino, urea opcionalmente sustituido con grupos alquil, aril, heteroaril o heterociclicil, aminosulfonil opcionalmente N-mono- o N,N-di-sustituido con grupos alquil, aril o heteroaril, alquilsulfonilamino, arilsulfonilamino, heteroarilsulfonilamino, alquilcarbonilamino, arilcarbonilamino, heteroarilcarbonilamino, o similares.
- 15 **[0092]** Según se utiliza aquí, la expresión “arilcarbonilamino” designa el grupo $-NR^qC(O)R^f$, donde R^q es hidrógeno o alquil inferior o alquil y R^f es opcionalmente aril sustituido.
- [0093]** Según se utiliza aquí, la expresión “arileno” hace referencia a grupos aromáticos divalentes típicamente con entre 6 y hasta 14 átomos de carbono y “arileno sustituido” hace referencia a grupos arileno que contienen además uno o más sustituyentes según se establece aquí.
- 20 **[0094]** Según se utiliza aquí, la expresión “ariloxi” designa el grupo $-OAr$, donde Ar es un aril, o un grupo aril sustituido.
- [0095]** Según se utiliza aquí, la expresión “arilsulfonilamino” designa el grupo $-NR^qS(O)_2R^f$, donde R^q es hidrógeno o alquil inferior o alquil y R^f es opcionalmente aril sustituido.
- 25 **[0096]** Según se utiliza aquí, la expresión “un grupo carbamato” designa el grupo $-O-C(O)-NR_2$, donde cada R es independientemente H, alquil, alquil sustituido, aril o aril sustituido según se expone aquí.
- [0097]** Según se utiliza aquí, la expresión “grupo ditiocarbamato” designa el grupo $-S-C(S)-NR_2$, donde cada R es independientemente H, alquil, alquil sustituido, aril o aril sustituido según se establece aquí.
- 30 **[0098]** Según se utiliza aquí, la expresión “carbociclo” hace referencia a un grupo saturado, insaturado o aromático con un único anillo o múltiples anillos condensados compuestos de átomos de carbono unidos. El anillo o anillos puede(n) opcionalmente sustituirse o no con, p.ej., halógeno, alquil inferior, alcoxi, alquiltio, acetileno, amino, amido, carboxil, hidroxil, aril, ariloxi, heterociclo, hetaril, hetaril sustituido, nitro, ciano, tiol, sulfamido y similares.
- 35 **[0099]** Según se utiliza aquí, la expresión “cicliclquenil” hace referencia a grupos que contienen anillo cíclico con un intervalo de 3-20 átomos de carbono y con al menos un enlace doble carbono-carbono y “cicliclquenil sustituido” hace referencia a grupos cicloalquenil que contienen uno o más sustituyentes según se establece aquí.
- [0100]** Según se utiliza aquí, la expresión “cicloalquil” hace referencia a un grupo monocíclico o policíclico que contiene de 3 a 15 átomos de carbono y “cicloalquil sustituido” hace referencia a grupos cicloalquil que contienen además uno o más sustituyentes según se establece aquí.
- 40 **[0101]** Según se utiliza aquí, la expresión “cicloalquilenil” hace referencia a grupos que contienen anillo divalente con un intervalo de 3 a 12 átomos de carbono y “cicloalquilenil sustituido” hace referencia a grupos cicloalquilenil que contienen además uno o más sustituyentes según se establece aquí.
- 45 **[0102]** Según se utiliza aquí, la expresión “guanidinil” designa el grupo $-N=C(NH_2)_2$ y “guanidinil sustituido” designa el grupo $-N=C(NR_2)_2$, donde cada R es independientemente H, alquil, alquil sustituido, aril, o aril sustituido según se establece aquí.
- [0103]** Según se utiliza aquí, la expresión “halo” o “halógeno” hace referencia a todos los halógenos, es decir, cloro (Cl), fluoró (F), bromo (Br) y yodo (I).

[0104] Según se utiliza aquí, la expresión “heteroaril” hace referencia a una estructura de anillo aromático monocíclico conteniendo 5 o 6 átomos de anillo, o un grupo aromático bicíclico con entre 8 y 10 átomos, conteniendo uno o más, preferiblemente de 1 a 4, más preferiblemente de 1 a 3 y aún más preferiblemente de 1 a 2 heteroátomos seleccionados independientemente del grupo O, S y N y opcionalmente sustituido con entre 1 y 3 grupos o sustituyentes de halo, hidroxil, alcoxi, alquiltio, alquilsulfinil, alquilsulfonyl, aciloxi, ariloxi, heteroariloxi, amino opcionalmente mono o di-sustituido con alquil, aril o grupos heteroaril, amidino, urea opcionalmente sustituido con grupos alquil, aril, heteroaril, o grupos heterocíclico, aminosulfonyl opcionalmente N-mono- o N,N-di-sustituido con grupos alquil, aril o heteroaril, alquilsulfonylamino, arilsulfonylamino, heteroarilsulfonylamino, alquilcarbonilamino, arilcarbonilamino, heteroarilcarbonilamino, o similares. El heteroaril también pretende incluir S o N oxidado, como sulfinil, sulfonyl y N-óxido de un anillo de nitrógeno terciario. Un átomo de carbono o nitrógeno es el punto de enlace de la estructura de anillo heteroaril para que un anillo aromático estable se retenga. Los ejemplos de grupos heteroarilo son ftalimida, piridinil, piridazinil, pirazinil, quinazolinil, purinil, indolil, quinolinil, pirimidinil, pirrolil, oxazolil, tiazolil, tienil, isoxazolil, oxatiadiazolil, isotiazolil, tetrazolil, imidazolil, triazinil, furanil, benzofuril, indolil y similares. Un heteroaril sustituido contiene un sustituyente unido a un carbono o nitrógeno disponible para producir un compuesto estable.

[0105] Según se utiliza aquí, la expresión “heteroaril sustituido” hace referencia a un heterociclo opcionalmente mono o poli sustituido con uno o más grupos funcionales, p.ej., halógeno, alquil inferior, alcoxi inferior, alquiltio, acetileno, amino, amido, carboxil, hidroxil, aril, ariloxi, heterociclo, heterociclo sustituido, hetaril, hetaril sustituido, nitro, ciano, tiol, sulfamido y similares.

[0106] Según se utiliza aquí, la expresión “heteroarilcarbonilamino” designa el grupo $-NR^qC(O)R^r$, donde R^q es hidrógeno o alquil inferior y R^r es opcionalmente aril sustituido.

[0107] Según se utiliza aquí, la expresión “heteroariloxi” designa el grupo $-OHet$, donde Het es un grupo heteroaril opcionalmente sustituido.

[0108] Según se utiliza aquí, la expresión “heteroarilsulfonylamino” designa el grupo $-NR^qS(O)_2R^s$, donde R^q es hidrógeno o alquil inferior y R^s es opcionalmente heteroaril sustituido.

[0109] Según se utiliza aquí, la expresión “heterociclo” hace referencia a un grupo saturado, insaturado o aromático con un único anillo (p.ej., morfolino, piridil o furil) o múltiples anillos condensados (p.ej., naftpiridil, quinoxalil, quinolinil, indolizininil or benzo[b]tienil) con átomos de carbono y al menos un átomo hetero, como N, O o S, con el anillo, que opcionalmente puede sustituirse o no con, p.ej., halógeno, alquil inferior, alcoxi inferior, alquiltio, acetileno, amino, amido, carboxil, hidroxil, aril, ariloxi, heterociclo, hetaril, hetaril sustituido, nitro, ciano, tiol, sulfamido y similares.

[0110] Según se utiliza aquí, la expresión “heterociclo sustituido” hace referencia a heterociclo sustituido con 1 o más, p.ej., 1, 2 o 3, sustituyentes seleccionados del grupo que consiste en alquil opcionalmente sustituido, alqueniil opcionalmente sustituido, alquiniil opcionalmente sustituido, halo, hidroxil, aloxi, alquiltio, alquilsulfinil, alquilsulfonyl, aciloxi, aril, aril sustituido, ariloxi, heteroariloxi, amino, amido, amidino, urea opcionalmente sustituido con grupos alquil, aril, heteroaril o heterocíclico, aminosulfonyl opcionalmente N-mono- o N,N-di-sustituido con grupos alquil, aril o heteroaril, alquilsulfonylamino, arilsulfonylamino, heteroarilsulfonylamino, alquilcarbonilamino, arilcarbonilamino, heteroarilcarbonilamino, acil, carboxil, heterociclo, heterociclo sustituido, hetaril, hetaril sustituido, nitro, ciano, tiol, sulfonamido, y oxo, unido a cualquier punto disponible para producir un compuesto estable.

[0111] Según se utiliza aquí, la expresión “hidrocarbilo” hace referencia a cualquier radical orgánico donde la cadena central del mismo comprende carbono e hidrógeno únicamente. Por lo tanto, el hidrocarbilo abarca alquil, cicloalquil, alqueniil, cicloalqueniil, alquiniil, aril, alquilaril, arilalquil, arilalqueniil, alqueniilaril, arilalquiniil, alquiniilaril y similares.

[0112] Según se utiliza aquí, la expresión “hidrocarbilo sustituido” hace referencia a cualquiera de los grupos de hidrocarbilo arriba mencionados que contienen además uno o más sustituyentes seleccionados de entre hidroxil, hidrocarbilo, hidrocarbilo sustituido, alquiltio, alquiltio sustituido, ariltio, ariltio sustituido, amino, alquilamino, alquilamino sustituido, carboxil, $-C(S)SR$, $-C(O)SR$, $-C(S)NR_2$, donde cada R es independientemente hidrógeno, alquil o alquil sustituido, nitro, ciano, halo, $-SO_3M$ o $-OSO_3M$, donde M es H, Na, K, Zn, Ca o meglumina, guanidinil, guanidinil sustituido, hidrocarbilo, hidrocarbilo sustituido, hidrocarbilocarbonil, hidrocarbilocarbonil sustituido, hidrocarbilocarboniloxi, hidrocarbilocarboniloxi sustituido, acil, aciloxi, heterocíclico, heterocíclico sustituido, heteroaril, heteroaril sustituido, heteroarilocarbonil, heteroarilocarbonil sustituido, carbamoil, monoalquilcarbamoil, dialquilcarbamoil, arilcarbamoil, un grupo carbamato, un grupo ditiocarbamato, aroil, aroil sustituido, organosulfonyl, organosulfonyl sustituido, organosulfinil, alquilsulfinil sustituido, alquilsulfonylamino, alquilsulfonylamino sustituido, arilsulfonylamino, arilsulfonylamino sustituido, un grupo sulfonamida, sulfonyl, y similares, incluyendo dos o más de los grupos arriba mencionados

unidos a la fracción de hidrocarbilo mediante las fracciones de enlace/espaciador como -O-, -S-, -NR-, donde R es hidrógeno, alquil o alquil sustituido, -C(O)-, -C(S)-, -C(=NR')-, -C(=CR'2)-, donde R' es alquil o alquil sustituido, -OC(O)-, -O-C(O)-O-, -O-C(O)-NR- (or -NR-C(O)-O-), -NR-C(O)-, -NR-C(O)-NR-, -S-C(O)-, -S-C(O)-O-, -S-C(O)-NR-, -OS(O)2-, -O-S(O)2-O-, -O-S(O)2-NR-, -O-S(O)-, -O-S(O)-O-, -O-S(O)-NR-, -O-NR-C(O)-, -O-NR-C(O)-O-, -O-NRC(O)-NR-, -NR-O-C(O)-, -NR-O-C(O)-O-, -NR-O-C(O)-NR-, -O-NR-C(S)-, -O-NR-C(S)-O-, -O-NR-C(S)-NR-, -NR-OC(S)-, -NR-O-C(S)-O-, -NR-O-C(S)-NR-, -O-C(S)-, -O-C(S)-O-, -O-C(S)-NR- (or -NR-C(S)-O-), -NR-C(S)-, -NRC(S)-NR-, -S-S(O)2-, -S-S(O)2-O-, -S-S(O)2-NR-, -NR-O-S(O)-, -NR-O-S(O)-O-, -NR-O-S(O)-NR-, -NR-O-S(O)2-, -NRO-S(O)2-O-, -NR-O-S(O)2-NR-, -O-NR-S(O)-, -O-NR-S(O)-O-, -O-NR-S(O)-NR-, -O-NR-S(O)2-O-, -O-NR-S(O)2-NR-, -O-NR-S(O)2-, -O-P(O)R2-, -S-P(O)R2-, o -NR-P(O)R2-, donde cada R es independientemente hidrógeno, alquil o alquil sustituido y similares.

[0113] Según se utiliza aquí, la expresión "hidrocarbiloxi" designa grupos -O-hidrocarbilo que contienen de 2 a 20 átomos de carbono e "hidrocarbiloxi sustituido" hace referencia a grupos de hidrocarbiloxi que contienen además uno o más sustituyentes según se establece aquí.

[0114] Según se utiliza aquí, la expresión "hidrocarbilo carbonil" hace referencia a grupos -C(O)-hidrocarbilo que contienen de 2 a 20 átomos de carbono e "hidrocarbilo carbonil sustituido" hace referencia a grupos de hidrocarbilo carbonil que contienen además uno o más sustituyentes según se establece aquí.

[0115] Según se utiliza aquí, la expresión "hidrocarbilo oxycarbonil" hace referencia a -C(O)-O-hidrocarbilo conteniendo de 2 a 20 átomos de carbono e "hidrocarbilo oxycarbonil sustituido" hace referencia a grupos hidrocarbilo oxycarbonil que contienen además uno o más sustituyentes según se expone aquí.

[0116] Según se utiliza aquí, la expresión "hidrocarbilo carboniloxi" hace referencia a grupos -O-C(O)-hidrocarbilo de 2 a 20 átomos de carbono e "hidrocarbilo carboniloxi sustituido" hace referencia a grupos hidrocarbilo carboniloxi que contienen además uno o más sustituyentes según se expone aquí.

[0117] Según se utiliza aquí, la expresión "hidrocarbilo" hace referencia a cualquier radical orgánico donde la cadena central del mismo comprende carbono e hidrógeno únicamente. Así, el hidrocarbilo abarca alquileo, cicloalquileo, alqueno, cicloalqueno, alquino, arileno, alquilarileno, arilalquileo, arilalqueno, alquenoarileno, arilalquino, alquinoarileno y similares e "hidrocarbilo sustituido" hace referencia a cualquiera de los grupos hidrocarbilo arriba mencionados sosteniendo además uno o más sustituyentes según se expone aquí.

[0118] Según se utiliza aquí, la expresión "hidroxilo" o "hidroxilo" hace referencia al grupo -OH.

[0119] Según se utiliza aquí, la expresión "organosulfonilo" designa el grupo -S(O)-órgano, donde órgano abarca fracciones alquilo-, alcoxi-, alquilamino- y arilo, así como fracciones de alquilo-, alcoxi-, alquilamino- y arilo sustituido.

[0120] Según se utiliza aquí, la expresión "organosulfonilo" designa el grupo -S(O)2-órgano, donde órgano abarca fracciones alquilo-, alcoxi- y alquilamino-, así como fracciones alquilo-, alcoxi- o alquilamino- sustituido.

[0121] Según se utiliza aquí, la expresión "oxo" hace referencia a un sustituyente de oxígeno doble unido al carbono adherido.

[0122] Según se utiliza aquí, la expresión "sulfonilo" designa el grupo -S(O)-.

[0123] Según se utiliza aquí, la expresión "sulfonilo sustituido" designa el grupo -S(O)R^t, donde R^t es un alquilo inferior, alquilo inferior sustituido, cicloalquilo, cicloalquilo sustituido, cicloalquiloalquilo, cicloalquiloalquilo sustituido, heterociclo, heterociclo sustituido, heterocicloalquilo, heterocicloalquilo sustituido, arilo, arilo sustituido, heteroarilo, heteroarilo sustituido, heteroariloalquilo, heteroariloalquilo sustituido, ariloalquilo o ariloalquilo sustituido.

[0124] Según se utiliza aquí, la expresión "sulfonilo" designa el grupo -S(O)2-.

[0125] Según se utiliza aquí, la expresión "sulfonilo sustituido" designa el grupo -S(O)2R^t, donde R^t es alquilo inferior, alquilo inferior sustituido, cicloalquilo, cicloalquilo sustituido, cicloalquiloalquilo, cicloalquiloalquilo sustituido, heterociclo, heterociclo sustituido, heterocicloalquilo, heterocicloalquilo sustituido, arilo, arilo sustituido, heteroarilo, heteroarilo sustituido, heteroariloalquilo, heteroariloalquilo sustituido, ariloalquilo o ariloalquilo sustituido.

[0126] Según se utiliza aquí, la expresión "sulfonilamino" designa el grupo -NR^qS(O)2- donde R^q es hidrógeno o alquilo inferior.

[0127] Según se utiliza aquí, la expresión "sulfonilamino sustituido" designa el grupo -NR^qS(O)2R^u, donde R^q es hidrógeno o alquilo inferior y R^u es alquilo inferior, alquilo inferior sustituido, cicloalquilo, cicloalquilo sustituido,

heterocicliil, heterocicliil sustituido, aril, aril sustituido, heteroaril, heteroaril sustituido, heteroaralquil, heteroaralquil sustituido, aralquil o aralquil sustituido.

[0128] Según se utiliza aquí, la expresión “sulfuril” designa el grupo $-S(O)_2-$.

5 [0129] Según se utiliza aquí en conexión con los valores numéricos, el término “aproximadamente” o “alrededor de” significa 10% del valor indicado.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LAS FIGURAS

[0130]

La figura 1 es una representación esquemática del mecanismo de la formación de enlace fosfodiéster mediante ADNligasas dependientes de ATP y dependientes de NAD⁺.

10 La figura 2 muestra resultados de gel PAGE de las reacciones de ligadura en ausencia de ligasa (vía 2), en ausencia de ATP (vía 3), en ausencia del molde de ácido nucleico (vía 4) y un control positivo (dador, aceptor, cofactor ATP, ligasa y molde) (vía 5).

15 Las figuras 3A-3C muestran resultados de un experimento PCR a tiempo real para detectar el producto de ligadura. La figura 3A representa curvas de amplificación de una serie de seis diluciones de un producto de ligadura, incluyendo un control (NTC) a partir de una ligadura elaborada en ausencia del molde. La figura 3B representa una curva de disociación a partir de las reacciones elaboradas en la Figura 3A. La figura 3C muestra una curva estándar en la que los valores Ct extraídos de la curva estándar se trazaron frente al factor de dilución.

20 La figura 4 muestra resultados de gel PAGE a partir de reacciones de ligadura con los siguientes cofactores modificados: 7-deaza-ATP, N1-metil-ATP, 2-amino-ATP, 2'-amino-2'-deoxi-ATP, 3'-amino-2',3'-dideoxi-ATP comparados con las reacciones de ligadura utilizando ATP con pares de bases emparejados (T-A) y mal emparejados (C-A) en el extremo 3' de la hebra aceptor.

25 La figura 5 es una serie de diagramas de dispersión que evalúan 10 cofactores ATP modificados por la producción de ligadura relativa en presencia de un par de bases emparejado en el extremo 3' de la hebra del aceptor (T-A) con la producción relativa de tres pares de bases modelo diferentes mal emparejados en el extremo 3' de la hebra aceptor (C-A, G-A y A-A). Preferiblemente, un cofactor modificado con una especificidad mejorada relativo a un cofactor sin modificar tiene una producción de ligadura similar a un emparejamiento T-A (valor cerca de 1 en el eje y) y una producción de ligadura mal emparejada (C-A, G-A y A-A) cercana a cero en el eje x.

30 La figura 6 es una serie de diagramas de dispersión evaluando aceptores modificados por la producción de ligadura relativa en presencia de un par de bases emparejado en el extremo 3' de la hebra aceptor (T-A) con la producción relativa con tres pares de bases diferentes mal emparejados en el extremo 3' de la hebra aceptor (T-G, T-C y T-T), según se describe en el ejemplo 1. Los aceptores modificados estudiados contenían un único grupo de sustitución: PS (X1) indica S en la posición X¹, PS (X2) indica S en la posición X², PMe (X1) indica Me en la posición X¹, PMe (X2) indica Me en la posición X², 2'-OMe (Y1) indica OCH₃ en la posición Y¹, 2'-OMe (Y2) indica OCH₃ en la posición Y², 2'-OMe (Y3) indica OCH₃ en la posición Y³, 2'-F (Y1) indica F en la posición Y¹, 2'-F (Y2) indica F en la posición Y² y 2'-F (Y3) indica F en la posición Y³, según se define en la fórmula II. Preferiblemente, un candidato aceptor modificado con una especificidad mejorada relativa a un aceptor sin modificar tendrá una producción de ligadura similar a un emparejamiento T-A (valor cerca de 1 en el eje y) y una producción de ligadura de mal emparejamiento (C-A, G-A y A-A) cerca de cero en el eje x.

45 La figura 7 es una serie de diagramas de dispersión evaluando los dadores modificados para la producción de ligadura relativa en presencia de un par de bases emparejado en el extremo 3' de la hebra aceptor (T-A) con la producción relativo con dos pares de bases mal emparejados diferentes en el extremo 3' de la hebra aceptor (T-C, y C-A) según se describe en el ejemplo 1. Los dadores modificados contenían un único grupo de sustitución: PMe (X1) indica Me en la posición X¹, PMe (X2) indica Me en la posición X², 2'-Ome (Y1) indica OCH₃ en la posición Y¹, 2'-Ome (Y2) indica OCH₃ en la posición Y² y 2'-Ome (Y3) indica OCH₃ en la posición Y³, según se define en la fórmula III. Preferiblemente, un dador modificado con una especificidad mejorada relativa a un dador sin modificar tiene una producción de ligadura similar a la producción de ligadura de emparejamiento T-A (valor cercano a 1 en el eje y) y una producción de ligadura de mal emparejamiento (C-A, G-A y A-A) cercano a cero en el eje x.

50 La figura 8 muestra tablas de producciones de ligadura relativas utilizando hebras de aceptor modificado de cadena central y de azúcar en combinación con diferentes cofactores ATP modificados. Estos valores son

relativos a las producciones de ligadura utilizando hebras de aceptor natural y ATP con pares de bases emparejados (T-A) y mal emparejados (T-C) en el extremo 3' de la hebra aceptor, según se describe en el ejemplo 1. En el caso emparejado (T-A), los valores en las celdas sombreadas con puntos representan una producción de ligadura relativa mayor a 0,85, los valores en las celdas sin sombrear representan una producción de ligadura relativa de 0,70-0,85 y los valores en las celdas sombreadas en gris representan una producción de ligadura relativa de 0-0,70. En el caso mal emparejado (T-C), los valores en las celdas sombreadas con puntos representan una producción de ligadura relativa de 0,0-0,01, los valores de celdas sin sombrear representan una producción de ligadura relativa de 0,01-0,10 y los valores en celdas sombreadas en gris representan una producción de ligadura relativa de 0,10-1,00. Las combinaciones con criterios de rendimiento preferidos tienen una producción relativa mayor a 0,85 en el caso emparejado (T-A) (p.ej., las celdas sombreadas con puntos en la Figura 8, gráfico superior) y menor a 0,01 en presencia de un molde mal emparejado (T-C) (p.ej., las celdas sombreadas con puntos en la figura 8, gráfico inferior).

DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCIÓN

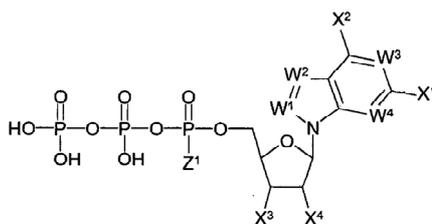
[0131] Una reacción de ligadura de ácido nucleico incluye (a) adenilación de la enzima ligasa, (b) hibridación de los polinucleótidos dador y aceptor en un ácido nucleico diana seguido por (c) transferencia del adenilato a la hebra dador y la ligadura para formar una copia unida complementaria de la secuencia de ácido nucleico mediante un ácido nucleico ligasa. Sin embargo, la ligadura de dadores y aceptores puede ocurrir 1) cuando el dador o aceptor están mal emparejados (no son complementario) en relación con el molde de ácido nucleico o 2) en ausencia de un molde de ácido nucleico.

[0132] Los métodos y composiciones proporcionan aquí métodos y composiciones mejorados para una ligadura de ácido nucleico. En aspectos particulares, los métodos y composiciones se dirigen al uso de componentes de ligadura modificados en reacciones de ligadura enzimática. En otros aspectos, el proceso de ligadura de ácido nucleico emplea uno o más cofactores modificados, dador modificado y/o aceptor modificado, la presencia de los cuales afecta la formación de productos de ligadura no deseados en ausencia de molde o en presencia de malos emparejamientos.

Cofactores de ligasa modificados

[0133] Ciertos aspectos y modos de realización de las composiciones y métodos aquí proporcionados incluyen al menos un cofactor de ligasa modificado. En modos de realización preferidos, el cofactor de ligasa modificado es un ATP modificado con uno o más grupos de sustitución.

[0134] En modos de realización de los aspectos aquí presentados, los ATPs modificados y derivados de los mismos de acuerdo con la invención proporcionan compuestos de Fórmula IA:



donde:

W^1 , W^2 , W^3 y W^4 están independientemente seleccionados del grupo que consiste en N, CR^1 y N^+R^1 ;

35 cada R^1 está seleccionado de manera independiente del grupo que consiste en H, F, Cl, Br, I, OR^2 , SR^2 , SeR^2 , NR^2R^3 , N_3 , $C(Y)R^4$, alquenil, alquiniil, aril, aralquili y alquili sustituido o no sustituido,

donde cualquier sustituyente puede contener opcionalmente uno o más heteroátomos;

Z^1 se selecciona del grupo que consiste en H, F, R^2 , OR^2 , SR^2 , SeR^2 , NR^2R^3 , NR^2OR^2 , $NR^2-NR^2R^3$, CN, N_3 , $(BH_3)^M+$ y $C(Y)R^4$;

40 M^+ es un catión;

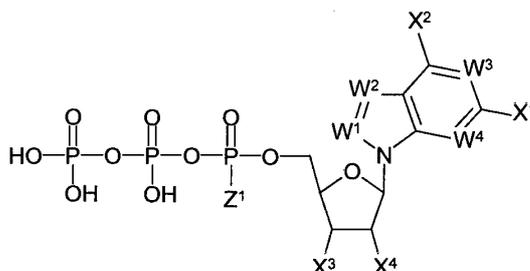
cada R^2 y cada R^3 está seleccionados independientemente del grupo que consiste en H o alquenil, alquiniil, aril, aralquili y alquili sustituido o no sustituido.

donde cualquier sustituyente puede contenter opcionalmente uno o más heteroátomos;

cada R^4 se selecciona del grupo que consiste en H, F, Cl, Br, OR^2 , SR^2 , SeR^2 , NR^2R^3 , $C(Y)R^2$ y alquenil, alquinil, aril, aralquil y alquil sustituido o no sustituido, donde cualquier sustituyente puede contener opcionalmente uno o más heteroátomos;

5 cada Y se selecciona del grupo que consiste en O, S, Se, CR^1R^1 y NR^1 ; y X^1 , X^2 , X^3 y X^4 se selecciona cada uno de manera independiente del grupo que consiste en R^1 , NR^2OR^2 , $NR^2-NR^2R^3$, CN, N_3 , NO, NO_2 , NCO, NCS, OCN, SCN, and SSR^2 .

[0135] Los modos de realización preferidos de ATP modificado tienen la estructura:



donde:

10 W^1 , W^2 , W^3 y W^4 se seleccionan de manera independiente del grupo que consiste en N, N^+-CH_3 , $N^+-CH_2CH_3$, $N^+-CH_2CH_2CH_3$, $N^+-CH_2CH_2CH_2CH_3$, $N^+-CH(CH_3)_2$, CH, C- CH_3 , C- CH_2CH_3 , C- $CH_2CH_2CH_3$, C- $CH_2CH_2CH_2CH_3$, C- $CH(CH_3)_2$, C- NH_2 , C- $NHCH_3$, C- $N(CH_3)_2$, C- N_3 y C-OH;

15 Z^1 se selecciona del grupo que consiste en H, F, CH_3 , fenil, OCH_3 , OCH_2CH_3 , $OCH_2CH_2CH_3$, $OCH_2CH_2CH_2CH_3$, $OCH(CH_3)_2$, SH, SCH_3 , SCH_2CH_3 , $SCH_2CH_2CH_3$, $SCH_2CH_2CH_2CH_3$, $SCH(CH_3)_2$, SeH, $SeCH_3$, $SeCH_2CH_3$, $SeCH_2CH_2CH_3$, $SeCH_2CH_2CH_2CH_3$, $SeCH(CH_3)_2$, NH_2 , $NHCH_3$, NCH_3CH_3 , $NHOCH_3$, NCH_3OCH_3 , $NH-NH_2$, $NH-NHCH_3$, $NH-NCH_3CH_3$, NCH_3-NH_2 , NCH_3-NHCH_3 , $NCH_3-NCH_3CH_3$, CN, N_3 y $(BH_3)^- M^+$;

M^+ es un catión;

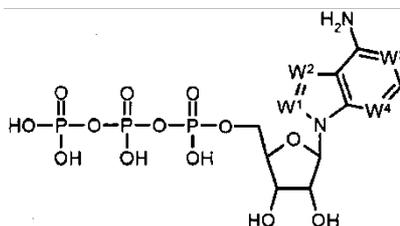
X^1 se selecciona del grupo que consiste en H, NH_2 , OH, $NHCH_3$ y $N(CH_3)_2$;

20 X^2 se selecciona del grupo que consiste en H, Cl, OH, NH_2 , $NHCH_3$ y $N(CH_3)_2$;

X^3 se selecciona del grupo que consiste en H, F, CH_3 , OH, SH, OCH_3 , NH_2 , $NHCH_3$, $N(CH_3)_2$ y N_3 ; y

X^4 se selecciona del grupo que consiste en H, F, OH, OCH_3 , NH_2 , $NHCH_3$, $N(CH_3)_2$, y N_3 .

[0136] Los modos de realización preferidos de ATP modificado tienen la estructura:



25 donde:

W^1 , W^2 , W^3 y W^4 se seleccionan independientemente del grupo que consiste en N, CR^1 y N^+R^1 ; y

cada R^1 se selecciona independientemente del grupo que consiste en H, F, Cl, Br, I, OR^2 , SR^2 , SeR^2 , NR^2R^3 , N_3 , $C(Y)R^4$, y alquenil, alquinil, aril, aralquil y alquil sustituido o no sustituido,

donde cualquier sustituyente puede contener opcionalmente uno o más heteroátomos;

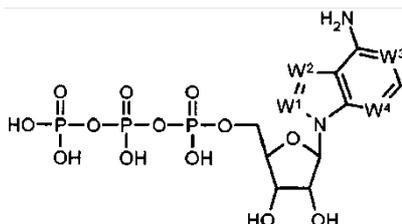
30 cada R^2 y cada R^3 está seleccionado independientemente del grupo que consiste en H o alquenil, alquinil, aril, aralquil y alquil sustituido o no sustituido,

donde cualquier sustituyente puede opcionalmente contener uno o más heteroátomos;

cada R^4 se selecciona del grupo que consiste en H, F, Cl, Br, OR^2 , SR^2 , SeR^2 , NR^2R^3 , $C(Y)R^2$ y alquenil, alquinil, aril, aralquil y alquil sustituido o no sustituido,

5 donde cualquier sustituyente puede opcionalmente contener uno o más heteroátomos; y cada Y se selecciona del grupo que consiste en O, S, Se, CR^1R^1 y NR^1 .

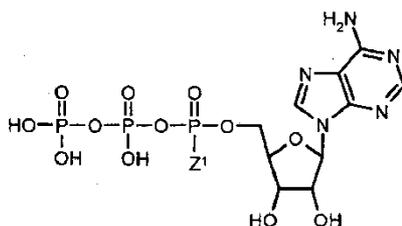
[0137] Los modos de realización preferidos de ATP modificado tienen la estructura:



donde:

10 W^1 , W^2 , W^3 y W^4 se seleccionan independientemente del grupo que consiste en N, N^+-CH_3 , $N^+-CH_2CH_3$, $N^+-CH_2CH_2CH_3$, $N^+-CH_2CH_2CH_2CH_3$, $N^+-CH(CH_3)_2$, CH, C- CH_3 , C- CH_2CH_3 , C- $CH_2CH_2CH_3$, C- $CH_2CH_2CH_2CH_3$, C- $CH(CH_3)_2$, C- NH_2 , C- $NHCH_3$, C- $N(CH_3)_2$, C- N_3 y C-OH.

[0138] Los modos de realización preferidos de ATP modificado tienen la estructura:



donde:

15 Z^1 se selecciona del grupo que consiste en H, F, R^1 , OR^1 , SR^1 , SeR^1 , NR^1R^2 , NR^1OR^1 , $NR^1-NR^1R^1$, CN, N_3 , $(BH_3)^+M^+$ y $C(Y)R^2$;

M^+ es un catión;

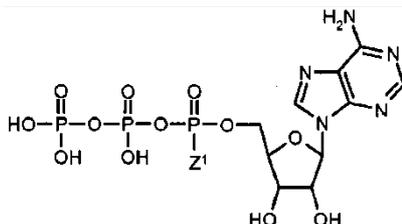
cada R^1 se selecciona independientemente del grupo que consiste en H o alquenil, alquinil, aril, aralquil y alquil sustituido o no sustituido,

20 donde cualquier sustituyente puede contener opcionalmente uno o mas heteroátomos;

cada R^2 se selecciona del grupo que consiste en H, F, Cl, Br, OR^1 , SR^1 , SeR^1 , NR^1R^1 , $C(Y)R^1$ y alquenil, alquinil, aril, aralquil y alquil sustituido o no sustituido,

donde cualquier sustituyente puede contener opcionalmente uno o más heteroátomos; y cada Y se selecciona del grupo que consiste en O, S, Se, CR^1R^1 y NR^1 .

25 **[0139]** Los modos de realización preferidos de ATP modificado tienen la estructura:

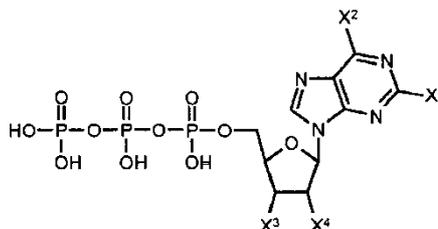


donde:

5 Z^1 se selecciona del grupo que consiste en H, F, CH₃, fenil, OCH₃, OCH₂CH₃, OCH₂CH₂CH₃, OCH₂CH₂CH₂CH₃, OCH(CH₃)₂, SH, SCH₃, SCH₂CH₃, SCH₂CH₂CH₃, SCH₂CH₂CH₂CH₃, SCH(CH₃)₂, SeH, SeCH₃, SeCH₂CH₃, SeCH₂CH₂CH₃, SeCH₂CH₂CH₂CH₃, SeCH(CH₃)₂, NH₂, NHCH₃, NCH₃CH₃, NHOCH₃, NCH₃OCH₃, NH-NH₂, NH-NHCH₃, NH-NCH₃CH₃, NCH₃-NH₂, NCH₃-NHCH₃, NCH₃-NCH₃CH₃, CN, N₃ y (BH₃)⁻ M⁺;

M⁺ es un catión

[0140] Los modos de realización preferidos de ATP modificado tienen la estructura:



10 donde:

X^1 , X^2 , X^3 y X^4 se seleccionan independientemente del grupo que consiste en R¹, NR²R³, NR²OR², NR²-NR²R³, CN, N₃, NO, NO₂, NCO, NCS, OCN, SCN y SSR²;

cada R¹ se selecciona independientemente del grupo que consiste en H, F, Cl, Br, I, OR², SR², SeR², NR²R³, C(Y)R⁴ y alquenil, alquinil, aril, aralquil y alquil sustituido o no sustituido,

15 donde cualquier sustituyente puede cada uno contener opcionalmente uno o más heteroátomos;

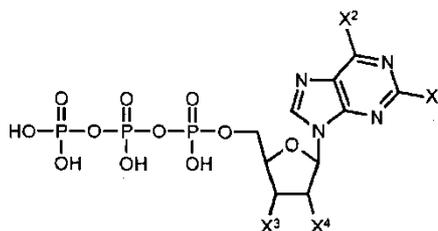
cada R² y cada R³ se selecciona independientemente del grupo que consiste en H o alquenil, alquinil, aril, aralquil y alquil sustituido o no sustituido,

donde cualquier sustituyente puede cada uno contener opcionalmente uno o más heteroátomos;

20 each R⁴ se selecciona del grupo que consiste en H, F, Cl, Br, OR², SR², SeR², NR²R³, C(Y)R² y alquenil, alquinil, aril, aralquil y alquil sustituido o no sustituido,

donde cualquier sustituyente puede cada uno contener opcionalmente uno o más heteroátomos; y cada Y se selecciona del grupo que consiste en O, S, Se, CR¹R¹ y NR¹.

[0141] Los modos de realización preferidos de ATP modificado tienen la estructura:



25 donde:

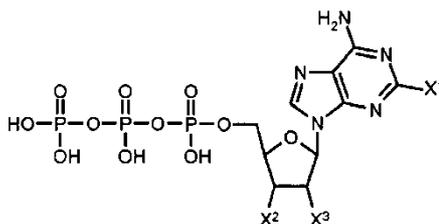
X^1 se selecciona del grupo que consiste en H, NH₂, OH, NHCH₃ y N(CH₃)₂;

X^2 se selecciona del grupo que consiste en H, Cl, OH, NH₂, NH(CH₃) y N(CH₃)₂;

X^3 se selecciona del grupo que consiste en H, F, CH₃, OH, SH, OCH₃, NH₂, NHCH₃, N(CH₃)₂ y N₃; y

X^4 se selecciona del grupo que consiste en H, F, OH, SH, OCH₃, NH₂, NHCH₃, N(CH₃)₂ y N₃.

30 [0142] Los modos de realización preferidos de ATP modificado tienen la estructura:



donde:

X^1 , X^2 y X^3 se selecciona cada uno independientemente del grupo que consiste en R^1 , NR^2OR^2 , $NR^2-NR^2R^3$, CN, N_3 , NO, NO_2 , NCO, NCS, OCN, SCN y SSR^2 ;

5 cada R^1 se selecciona independientemente del grupo que consiste en H, F, Cl, Br, I, OR^2 , SR^2 , SeR^2 , NR^2R^3 , N_3 , $C(Y)R^4$, y alquenil, alquinil, aril, aralquil y alquil sustituido o no sustituido,

donde cualquier sustituyente puede contener opcionalmente uno o más heteroátomos;

cada R^2 y cada R^3 se selecciona independientemente del grupo que consiste en H o alquenil, alquinil, aril, aralquil y alquil sustituido o no sustituido,

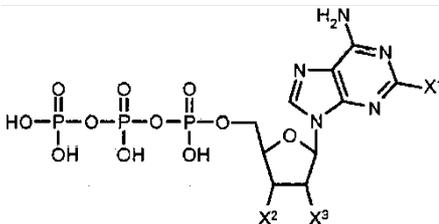
10 donde cualquier sustituyente puede contener opcionalmente uno o más heteroátomos;

cada R^4 se selecciona independientemente del grupo que consiste en H, F, Cl, Br, OR^2 , SR^2 , SeR^2 , NR^2R^3 , $C(Y)R^2$ y alquenil, alquinil, aril, aralquil y alquil sustituido o no sustituido,

donde cualquier sustituyente puede contener opcionalmente uno o más heteroátomos;

cada Y se selecciona del grupo que consiste en O, S, Se, CR^1R^1 y NR^1 .

15 **[0143]** Los modos de realización preferidos de ATP modificado tienen la estructura:



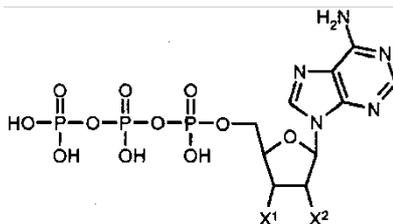
donde:

X^1 se selecciona del grupo que consiste en H, NH_2 , OH, $NHCH_3$, y $N(CH_3)_2$;

X^2 se selecciona del grupo que consiste en H, F, CH_3 , OH, SH, OCH_3 , NH_2 , $NHCH_3$, $N(CH_3)_2$ y N_3 ; y

20 X^3 se selecciona del grupo que consiste en H, F, OH, SH, OCH_3 , NH_2 , $NHCH_3$, $N(CH_3)_2$ y N_3 .

[0144] Los modos de realización preferidos de ATP modificado tienen la estructura:



donde:

25 X^1 y X^2 se selecciona cada uno independientemente del grupo que consiste en R^1 , NR^2OR^2 , $NR^2-NR^2R^3$, CN, N_3 , NO, NO_2 , NCO, NCS, OCN, SCN y SSR^2 ;

cada R^1 se selecciona cada uno independientemente del grupo que consiste en H, F, Cl, Br, I, OR^2 , SR^2 , SeR^2 , NR^2R^3 , N_3 , $C(Y)R^4$, alquenil, alquinil, aril, aralquil y alquil sustituido o no sustituido,

donde cualquier sustituyente puede contener opcionalmente uno o más heteroátomos;

5 cada R^2 y cada R^3 se selecciona cada uno independientemente del grupo que consiste en H o alquenil, alquinil, aril, aralquil y alquil sustituido o no sustituido,

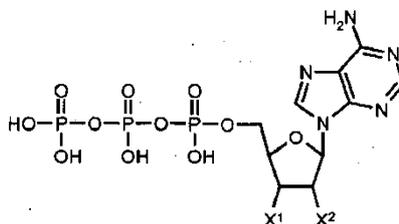
donde cualquier sustituyente puede contener opcionalmente uno o más heteroátomos;

cada R^4 se selecciona cada uno independientemente del grupo que consiste en H, F, Cl, Br, OR^2 , SR^2 , SeR^2 , NR^2R^3 , $C(Y)R^2$ y alquenil, alquinil, aril, aralquil y alquil sustituido o no sustituido,

donde cualquier sustituyente puede contener opcionalmente uno o más heteroátomos;

10 cada Y se selecciona cada uno independientemente del grupo que consiste en O, S, Se, CR^1R^1 y NR^1 .

[0145] Los modos de realización preferidos de ATP modificado tienen la estructura:

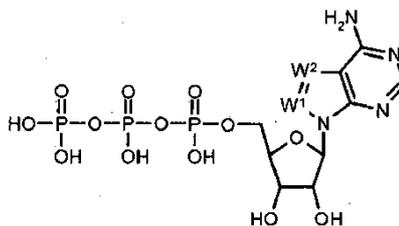


donde:

15 X^1 se selecciona cada uno independientemente del grupo que consiste en H, F, CH_3 , OH, SH, OCH_3 , NH_2 , $NHCH_3$, $N(CH_3)_2$, y N_3 ; y

X^2 se selecciona cada uno independientemente del grupo que consiste en H, F, OH, SH, OCH_3 , NH_2 , $NHCH_3$, $N(CH_3)_2$, y N_3 .

[0146] Los modos de realización preferidos de ATP modificado tienen la estructura:



20 donde:

W^1 y W^2 se selecciona cada uno independientemente del grupo que consiste en N, CR^1 , y N^+R^1 ; y

cada R^1 se selecciona independientemente del grupo que consiste en H, F, Cl, Br, I, OR^2 , SR^2 , SeR^2 , NR^2R^3 , N_3 , $C(Y)R^4$ y alquenil, alquinil, aril, aralquil y alquil sustituido o no sustituido,

donde cualquier sustituyente puede contener opcionalmente uno o más heteroátomos;

25 cada R^2 y cada R^3 se selecciona independientemente del grupo que consiste en H o alquenil, alquinil, aril, aralquil y alquil sustituido o no sustituido,

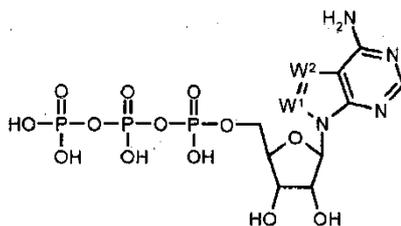
donde cualquier sustituyente puede contener opcionalmente uno o más heteroátomos;

cada R^4 se selecciona independientemente del grupo que consiste en H, F, Cl, Br, OR^2 , SR^2 , SeR^2 , NR^2R^3 , $C(Y)R^2$ y alquenil, alquinil, aril, aralquil y alquil sustituido o no sustituido,

30 donde cualquier sustituyente puede contener opcionalmente uno o más heteroátomos;

cada Y se selecciona independientemente del grupo que consiste en O, S, Se, CR¹R¹ y NR¹.

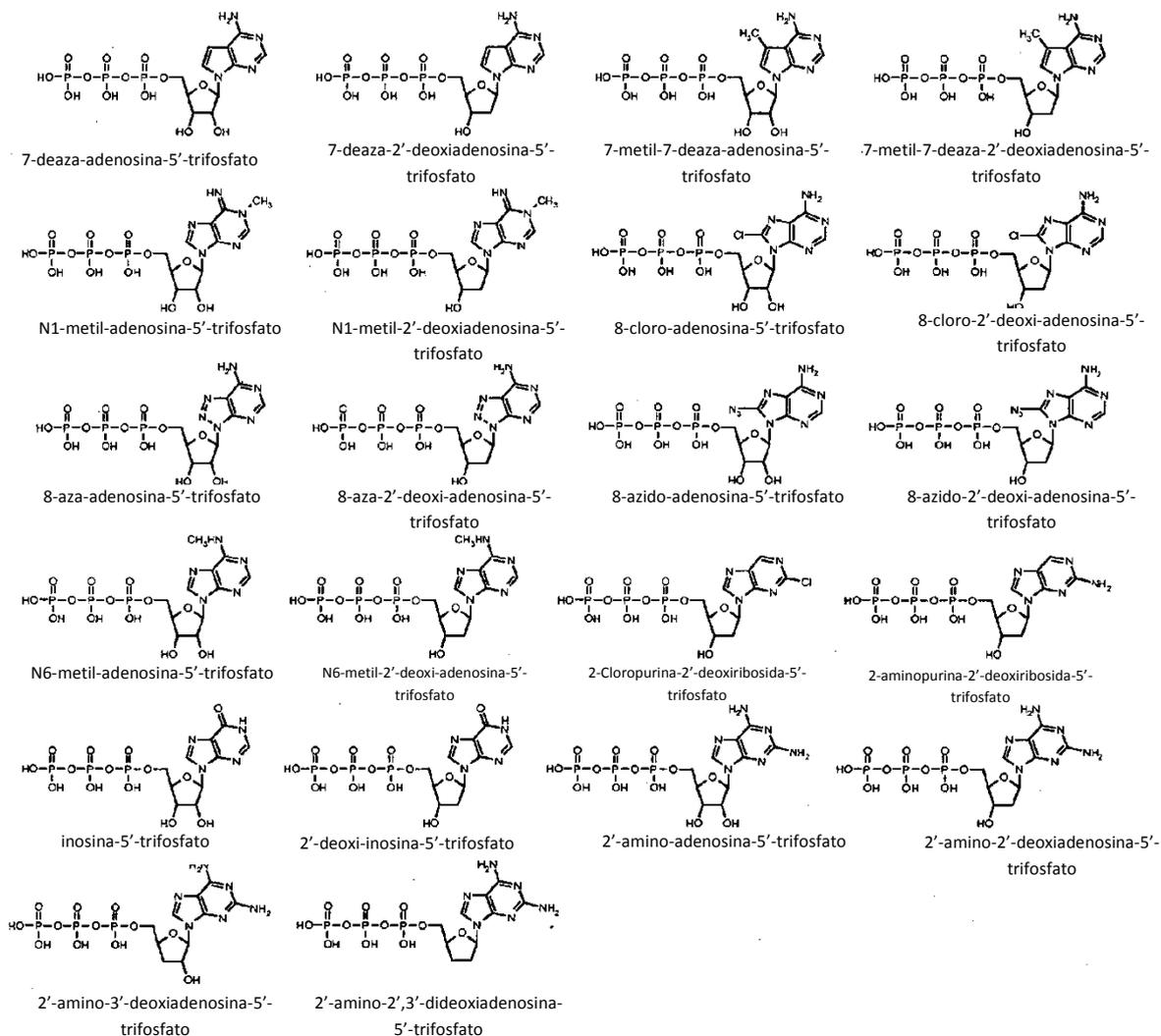
[0147] Los modos de realización de ATP modificado tienen la estructura:

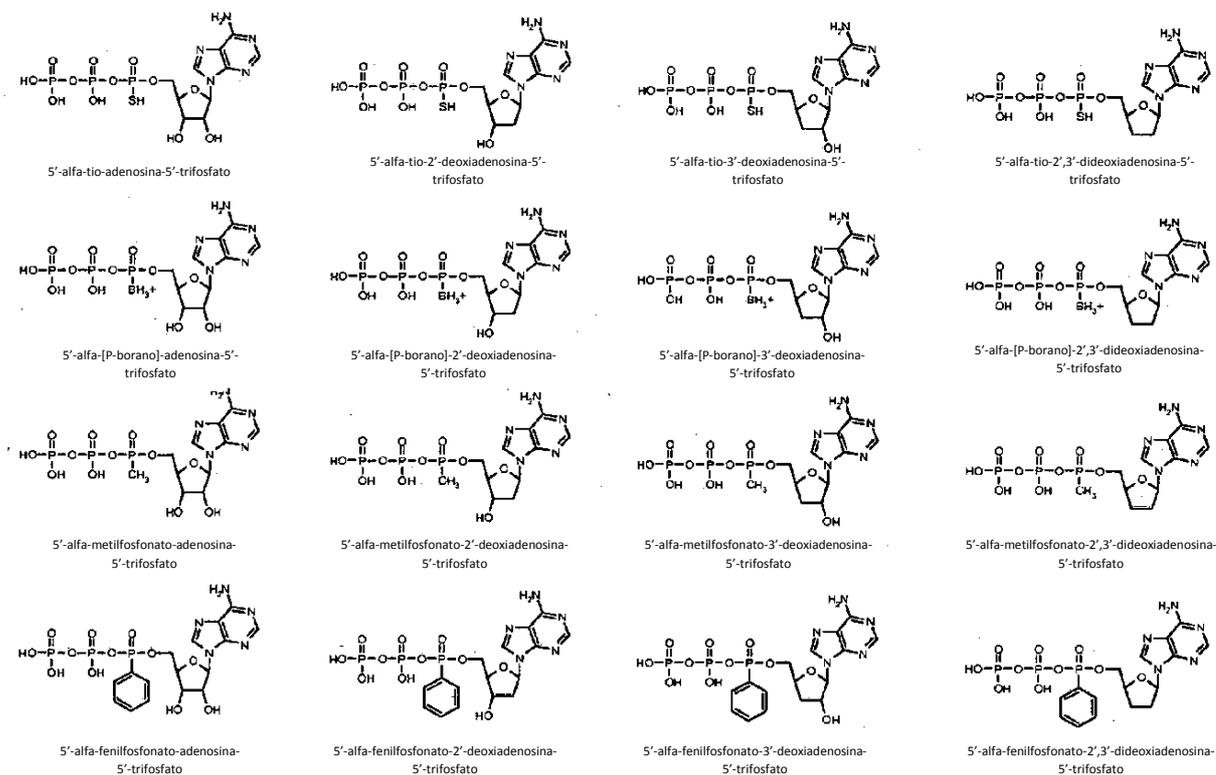


donde:

- 5 W^1 y W^2 se selecciona cada uno independientemente del grupo que consiste en N, N⁺-CH₃, N⁺-CH₂CH₃, N⁺-CH₂CH₂CH₂CH₃, N⁺-CH₂CH₂CH₂CH₂CH₃, N⁺-CH(CH₃)₂, CH, C-N₃, C-CH₃, C-CH₂CH₃, C-CH₂CH₂CH₃, C-CH₂CH₂CH₂CH₃, C-CH(CH₃)₂, C-NH₂, C-NHCH₃, C-N(CH₃)₂, and C-OH.

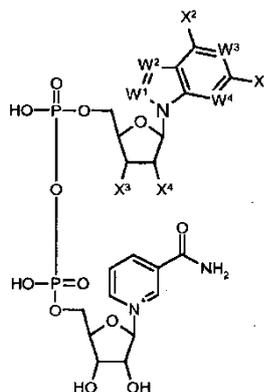
[0148] Ciertos modos de realización de ATP modificado son los siguientes:





[0149] Ciertos aspectos y modos de realización de las composiciones y métodos aquí proporcionados incluyen al menos un cofactor de ligasa modificado. En modos de realización preferidos, el cofactor de ligasa modificado es un NAD⁺ modificado con uno o más grupos de sustitución.

- 5 [0150] En modos de realización de los aspectos aquí presentados, los NAD⁺ modificados y derivados de los mismos de acuerdo con la invención proporcionan compuestos de la Fórmula IB:



donde:

W¹, W², W³ y W⁴ se selecciona independientemente del grupo que consiste en N, CR¹ y N⁺R¹;

- 10 cada R¹ se selecciona independientemente del grupo que consiste en H, F, Cl, Br, I, OR², SR², SeR², NR²R³, C(Y)R, y alquenil, alquinil, aril, aralquil y alquil sustituido o no sustituido,

donde cualquier sustituyente puede contener opcionalmente uno o más heteroátomos;

cada R² y cada R³ se selecciona independientemente del grupo que consiste en H o alquenil, alquinil, aril, aralquil y alquil sustituido o no sustituido,

- 15 donde cualquier sustituyente puede contener opcionalmente uno o más heteroátomos;

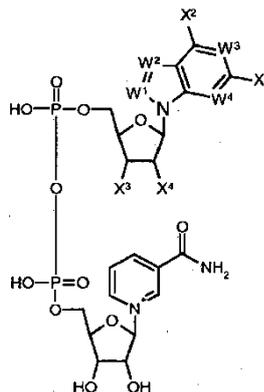
cada R^4 se selecciona independientemente del grupo que consiste en H, F, Cl, Br, OR^2 , SR^2 , SeR^2 , NR^2R^3 , $C(Y)R^2$, y alquenil, alquinil, aril, aralquil y alquil sustituido o no sustituido,

donde cualquier sustituyente puede contener opcionalmente uno o más heteroátomos;

5 cada Y se selecciona independientemente del grupo que consiste en O, S, Se, $C(R^1)_2$, y NR^1 ; y X^1 , X^2 , X^3 , y X^4 se selecciona independientemente del grupo que consiste en R^1 , NR^2OR^2 ,

$NR^2-NR^2R^3$, CN, N_3 , NO, NO_2 , NCO, NCS, OCN, SCN y SSR^2 .

[0151] Los modos de realización preferidos de NAD^+ modificado tienen la estructura:



donde:

10 W^1 , W^2 , W^3 y W^4 , se seleccionan independientemente del grupo que consiste en N, N^+-CH_3 , $N^+-CH_2CH_3$, $N^+-CH_2CH_2CH_3$, $N^+-CH_2CH_2CH_2CH_3$, $N^+-CH(CH_3)_2$, CH, C- CH_3 , C- CH_2CH_3 , C- $CH_2CH_2CH_3$, C- $CH_2CH_2CH_2CH_3$, C- $CH(CH_3)_2$, C- NH_2 , C- $NHCH_3$, C- $N(CH_3)_2$, C- N_3 y C-OH;

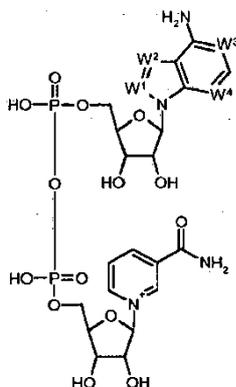
X^1 se selecciona independientemente del grupo que consiste en H, NH_2 , OH, $NHCH_3$ y $N(CH_3)_2$;

X^2 se selecciona independientemente del grupo que consiste en H, Cl, OH, NH_2 , $NH(CH_3)$ y $N(CH_3)_2$;

15 X^3 se selecciona independientemente del grupo que consiste en H, F, CH_3 , OH, SH, OCH_3 , NH_2 , $NHCH_3$, $N(CH_3)_2$ y N_3 ; y

X^4 se selecciona independientemente del grupo que consiste en H, F, OH, OCH_3 , NH_2 , $NHCH_3$, $N(CH_3)_2$ y N_3 .

[0152] Los modos de realización preferidos de NAD^+ modificado tienen la estructura:



20

donde:

W^1 , W^2 , W^3 y W^4 se selecciona cada uno independientemente del grupo que consiste en N, CR^1 y N^+R^1 ; y

cada R^1 se selecciona independientemente del grupo que consiste en H, F, Cl, Br, I, OR^2 , SR^2 , SeR^2 , NR^2R^3 , N_3 , $C(Y)R^4$, y o alquenil, alquinil, aril, aralquil y alquil sustituido o no sustituido,

donde cualquier sustituyente puede contener opcionalmente uno o más heteroátomos;

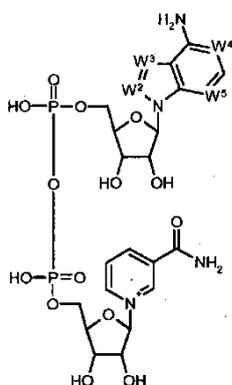
5 cada R^2 y cada R^3 se selecciona independientemente del grupo que consiste en H o alquenil, alquinil, aril, aralquil y alquil sustituido o no sustituido,

donde cualquier sustituyente puede contener opcionalmente uno o más heteroátomos;

cada R^4 se selecciona independientemente del grupo que consiste en H, F, Cl, Br, I, OR^2 , SR^2 , SeR^2 , NR^2R^3 , $C(Y)R^4$ y alquenil, alquinil, aril, aralquil y alquil sustituido o no sustituido,

10 donde cualquier sustituyente puede contener opcionalmente uno o más heteroátomos; y cada Y se selecciona independientemente del grupo que consiste en O, S, Se, CR^1R^1 y NR^1 .

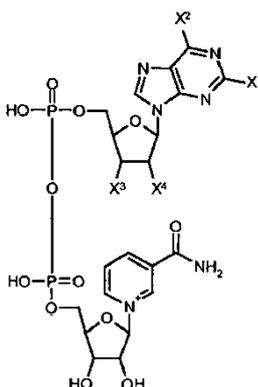
[0153] Los modos de realización preferidos de NAD⁺ modificado tienen la estructura:



donde:

15 W^2 , W^3 , W^4 , y W^5 se selecciona cada uno independientemente del grupo que consiste en N, N^+-CH_3 , $N^+-CH_2CH_3$, $N^+-CH_2CH_2CH_3$, $N^+-CH_2CH_2CH_2CH_3$, $N^+-CH(CH_3)_2$, CH, C- CH_3 , C- CH_2CH_3 , C- $CH_2CH_2CH_3$, C- $CH_2CH_2CH_2CH_3$, C- $CH(CH_3)_2$, C- NH_2 , C- $NHCH_3$, C- $N(CH_3)_2$, C- N_3 y C-OH.

[0154] Los modos de realización preferidos de NAD⁺ modificado tienen la estructura:



donde:

20 X^1 , X^2 , X^3 , y X^4 se selecciona cada uno independientemente del grupo que consiste en R^1 , NR^2OR^2 , $NR^2-NR^2R^3$, CN, N_3 , NO, NO_2 , NCO, NCS, OCN, SCN y SSR^2 ;

cada R^1 se selecciona independientemente del grupo que consiste en H, F, Cl, Br, I, OR^2 , SR^2 , SeR^2 , NR^2R^3 , $C(Y)R^4$, y alquenil, alquinil, aril, aralquil y alquil sustituido o no sustituido,

donde cualquier sustituyente puede contener opcionalmente uno o más heteroátomos;

cada R^2 y cada R^3 se selecciona independientemente del grupo que consiste en H o alquenil, alquinil, aril, aralquil y alquil sustituido o no sustituido,

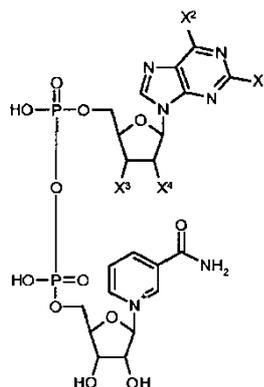
donde cualquier sustituyente puede contener opcionalmente uno o más heteroátomos;

5 cada R^4 se selecciona independientemente del grupo que consiste en H, F, Cl, Br, OR^2 , SR^2 , SeR^2 , NR^2R^3 , $C(Y)R^2$ y alquenil, alquinil, aril, aralquil y alquil sustituido o no sustituido,

donde cualquier sustituyente puede contener opcionalmente uno o más heteroátomos; y

cada Y se selecciona independientemente del grupo que consiste en O, S, Se, CR^1R^1 , y NR^1 .

[0155] Los modos de realización del NAD⁺ modificado tienen la estructura:



10 donde:

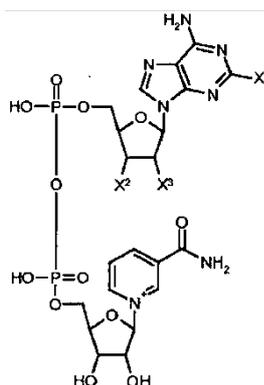
X^1 se selecciona del grupo que consiste en H, NH_2 , OH, $NHCH_3$ y $N(CH_3)_2$;

X^2 se selecciona del grupo que consiste en H, Cl, OH, NH_2 , $NH(CH_3)$ y $N(CH_3)_2$;

X^3 se selecciona del grupo que consiste en H, F, CH_3 , OH, SH, OCH_3 , NH_2 , $NHCH_3$, $N(CH_3)_2$ y N_3 ; y

X^4 se selecciona del grupo que consiste en H, F, OH, OCH_3 , NH_2 , $NHCH_3$, $N(CH_3)_2$ y N_3 .

15 [0156] Los modos de realización preferidos de NAD⁺ modificado tienen la estructura:



donde:

X^1 , X^2 y X^3 se selecciona cada uno independientemente del grupo que consiste en R^1 , NR^2OR^2 , $NR^2-NR^2R^3$, CN, N_3 , NO, NO_2 , NCO, NCS, OCN, SCN y SSR^2 ;

20 cada R^1 se selecciona independientemente del grupo que consiste en H, F, Cl, Br, I, OR^2 , SR^2 , SeR^2 , NR^2R^3 , $C(Y)R^4$, y alquenil, alquinil, aril, aralquil y alquil sustituido o no sustituido,

donde cualquier sustituyente puede contener opcionalmente uno o más heteroátomos;

cada R^2 y cada R^3 se selecciona independientemente del grupo que consiste en H o alquenil, alquinil, aril, aralquil y alquil sustituido o no sustituido,

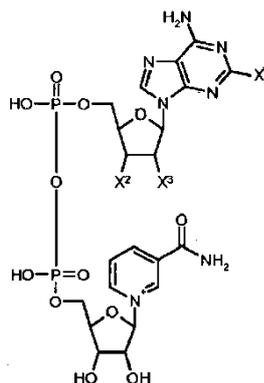
donde cualquier sustituyente puede contener opcionalmente uno o más heteroátomos;

5 cada R^4 se selecciona del grupo que consiste en H, F, Cl, Br, OR^2 , SR^2 , SeR^2 , NR^2R^3 , $C(Y)R^2$, y alquenil, alquinil, aril, aralquil y alquil sustituido o no sustituido,

donde cualquier sustituyente puede contener opcionalmente uno o más heteroátomos;

cada Y se selecciona del grupo que consiste en f O, S, Se, CR^1R^1 y NR^1 .

[0157] Los modos de realización preferidos de NAD⁺ modificado tienen la estructura:



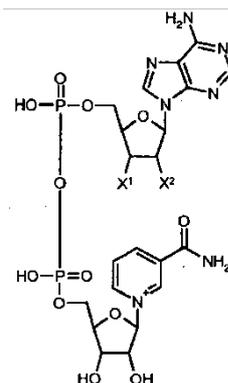
10 donde:

X^1 se selecciona del grupo que consiste en H, NH_2 , OH, $NHCH_3$ y $N(CH_3)_2$;

X^2 se selecciona del grupo que consiste en H, F, CH_3 , OH, SH, OCH_3 , NH_2 , $NHCH_3$, $N(CH_3)_2$ y N_3 ; y

X^3 se selecciona del grupo que consiste en H, F, OH, OCH_3 , NH_2 , $NHCH_3$, $N(CH_3)_2$ y N_3 .

[0158] Los modos de realización preferidos de NAD⁺ modificado tienen la estructura:



15

donde:

X^1 y X^2 se selecciona cada uno independientemente del grupo que consiste en R^1 , NR^2OR^2 , $NR^2-NR^2R^3$, CN, N_3 , NO, NO_2 , NCO, NCS, OCN, SCN y SSR^2 ;

20 cada R^1 se selecciona independientemente del grupo que consiste en H, F, Cl, Br, I, OR^2 , SR^2 , SeR^2 , NR^2R^3 , $C(Y)R^4$, y alquenil, alquinil, aril, aralquil y alquil sustituido o no sustituido,

donde cualquier sustituyente puede contener opcionalmente uno o más heteroátomos;

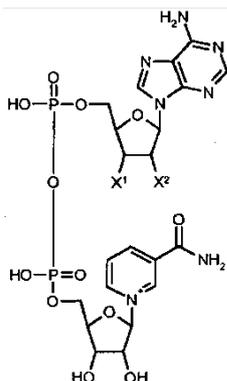
cada R^2 y cada R^3 se selecciona independientemente del grupo que consiste en H o alquenil, alquinil, aril, aralquil y alquil sustituido o no sustituido,

donde cualquier sustituyente puede contener opcionalmente uno o más heteroátomos;

cada R^4 se selecciona independientemente del grupo que consiste en H, F, Cl, Br, OR^2 , SR^2 , SeR^2 , NR^2R^3 , $C(Y)R^2$, y alquenil, alquinil, aril, aralquil y alquil sustituido o no sustituido,

5 donde cualquier sustituyente puede contener opcionalmente uno o más heteroátomos; y cada Y se selecciona del grupo que consiste en O, S, Se, CR^1R^1 y NR^1 .

[0159] Los modos de realización preferidos de NAD⁺ modificada tienen la estructura:

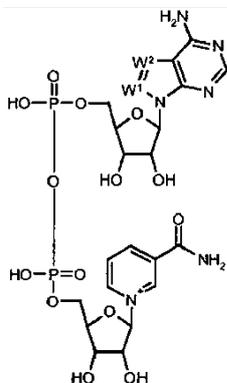


donde:

X¹ se selecciona del grupo que consiste en H, F, CH₃, OH, SH, OCH₃, NH₂, NHCH₃, N(CH₃)₂ y N₃; y

10 X² se selecciona del grupo que consiste en H, F, OH, OCH₃, NH₂, NHCH₃, N(CH₃)₂ y N₃.

[0160] Los modos de realización preferidos de NAD⁺ modificado tienen la estructura:



donde:

W¹ y W² se selecciona cada uno independientemente del grupo que consiste en N, CR^1 y N^+R^1 ; y

15 cada R^1 se selecciona independientemente del grupo que consiste en H, F, Cl, Br, I, OR^2 , SR^2 , SeR^2 , NR^2R^3 , N₃, $C(Y)R^4$, y alquenil, alquinil, aril, aralquil y alquil sustituido o no sustituido,

donde cualquier sustituyente puede contener opcionalmente uno o más heteroátomos;

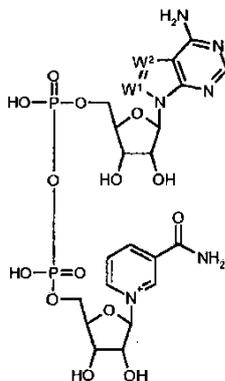
cada R^2 y cada R^3 se selecciona independientemente del grupo que consiste en H o alquenil, alquinil, aril, aralquil y alquil sustituido o no sustituido,

20 donde cualquier sustituyente puede contener opcionalmente uno o más heteroátomos;

cada R^4 se selecciona del grupo que consiste en H, F, Cl, Br, OR^2 , SR^2 , SeR^2 , NR^2R^3 , $C(Y)R^2$ y alquenil, alquinil, aril, aralquil y alquil sustituido o no sustituido,

donde cualquier sustituyente puede contener opcionalmente uno o más heteroátomos; y cada uno se selecciona del grupo que consiste en O, S, Se, CR¹R¹, and NR¹.

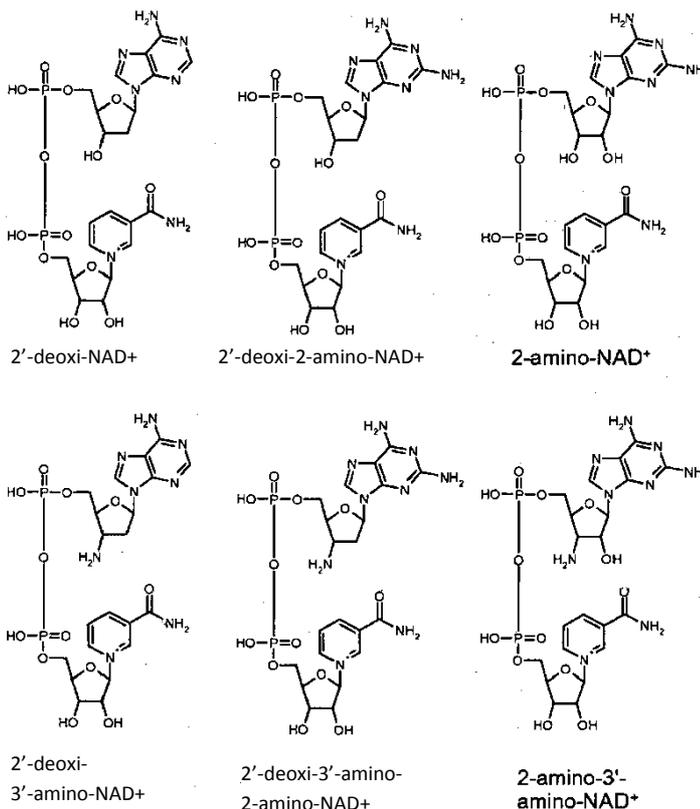
[0161] Los modos de realización de NAD⁺ modificado tienen la estructura:



5 donde:

W¹ y W² se selecciona cada uno independientemente del grupo que consiste en N, N⁺-CH₃, N⁺-CH₂CH₃, N⁺-CH₂CH₂CH₃, N⁺-CH₂CH₂CH₂CH₃, N⁺-CH(CH₃)₂, CH, C-N₃, C-CH₃, C-CH₂CH₃, C-CH₂CH₂CH₃, C-CH₂CH₂CH₂CH₃, C-CH(CH₃)₂, C-NH₂, C-NHCH₃, C-N(CH₃)₂ y C-OH.

[0162] Los modos de realización preferidos de NAD⁺ modificado tienen la estructura:



10

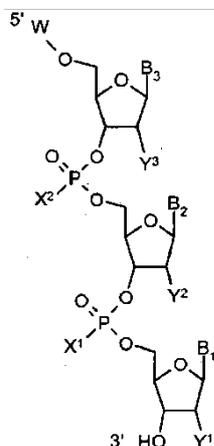
Aceptores modificados

[0163] Ciertos aspectos y modos de realización de las composiciones y métodos aquí proporcionados incluyen al menos un aceptor modificado. En modos de realización preferidos, el aceptor modificado tiene uno o más grupos de sustitución. En algunos modos de realización, los aceptores modificados adecuados para el uso con los métodos y composiciones aquí descritas incluyen aquellos que se describen en la técnica, por ejemplo, sondas

15

quiméricas de APN-ADN en Egholm, M., et al., Patente Estadounidense Núm. 6,297,016) y sondas sustituidas 3'-NH₂ (Fung, S., et al., Patente Estadounidense Núm. 5,593,826),

[0164] En modos de realización de los aspectos aquí presentados, los aceptores modificados y derivados de los mismos de acuerdo con la invención proporcionan compuestos de Fórmula II:



5

donde:

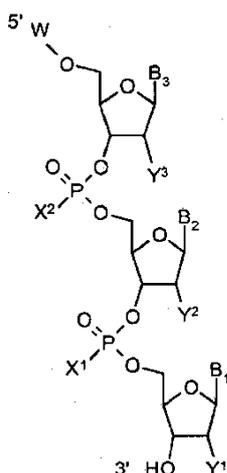
B¹, B², y B³ se seleccionan independientemente del grupo que consiste en purina o pirimidina sustituida o no sustituida, cualquier aza o deaza derivada de las mismas y cualquier "base universal" o "base degenerada", que es preferiblemente reconocible por un ácido nucleico polimerasa o ligasa;

10 X¹ y X² se selecciona cada uno independientemente del grupo que consiste en OH, SH, CH₃ y OCH₂CH₃;

Y¹, Y² e Y³ se selecciona cada uno independientemente del grupo que consiste en H, F, OH, y OCH₃; y

W se selecciona de H o un residuo oligonucleótido.

[0165] Los modos de realización preferidos de aceptores modificados tienen la estructura:



15

donde:

B¹, B², y B³ se seleccionan independientemente del grupo que consiste en purina o pirimidina sustituida o no sustituida, cualquier aza o deaza derivada de las mismas y cualquier "base universal" o "base degenerada", que es preferiblemente reconocible por un ácido nucleico polimerasa o ligasa;

X¹ se selecciona independientemente del grupo que consiste en OH, SH, OCH₂CH₃ y CH₃;

20 X² se selecciona independientemente del grupo que consiste en OH, SH, OCH₂CH₃ y CH₃;

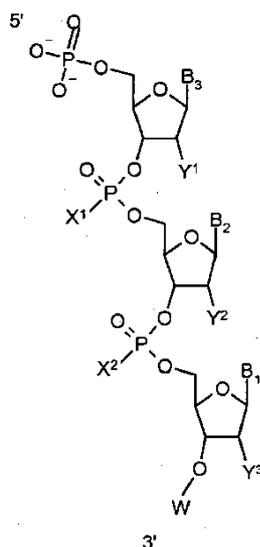
Y^1 , Y^2 e Y^3 se selecciona independientemente del grupo que consiste en H y OCH_3 ;

W se selecciona de H o de un residuo oligonucleótido.

Dadores modificados

5 **[0166]** Ciertos aspectos y modos de realización de las composiciones y métodos proporcionados aquí incluyen al menos un dador modificado. En modos de realización preferidos, el dador modificado tiene uno o más grupos de sustitución. En algunos modos de realización, los aceptores modificados adecuados para su uso con los métodos y composiciones aquí descritos incluyen aquellos según se describen en la técnica, por ejemplo, el uso de 5'-tiofosfatos en la hebra dador (5'-fosfato) (Bandaru, R., et al., Patentes Estadounidenses Núms. 6,811,986 y 6,635,425).

10 **[0167]** En los modos de realización de los aspectos aquí presentados, los dadores modificados y derivados de los mismos de acuerdo con la invención proporcionan compuestos de la Fórmula III:



donde:

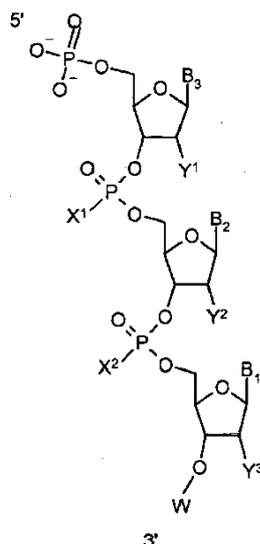
15 B^1 , B^2 , y B^3 se seleccionan independientemente del grupo que consiste en purina o pirimidina sustituida o no sustituida, cualquier aza o deaza derivada de las mismas y cualquier "base universal" o "base degenerada", que es preferiblemente reconocible por un ácido nucleico polimerasa o ligasa;

X^1 y X^2 se seleccionan independientemente del grupo que consiste en OH, SH, CH_3 y OCH_2CH_3 ;

Y^1 , Y^2 e Y^3 se selecciona cada uno independientemente del grupo que consiste en H, F, OH y OCH_3 ; y

W se selecciona de H o un residuo oligonucleótido.

20 **[0168]** Los modos de realización preferidos de dadores modificados tienen la estructura:



donde:

5 B^1 , B^2 , y B^3 se seleccionan independientemente del grupo que consiste en purina o pirimidina sustituida o no sustituida, cualquier aza o deaza derivada de las mismas y cualquier "base universal" o "base degenerada", que es preferiblemente reconocible por un ácido nucleico polimerasa o ligasa;

X^1 y X^2 se seleccionan independientemente del grupo que consiste en OH, SH, OCH_2CH_3 o CH_3 ;

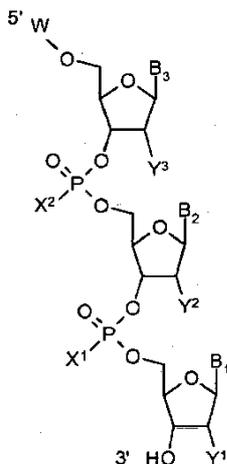
Y^1 , Y^2 e Y^3 se selecciona cada uno independientemente del grupo que consiste en H y OCH_3 ;

W se selecciona de H o un residuo oligonucleótido.

Combinaciones de cofactores de ligasa modificados, aceptores modificados y dadores modificados

10 **[0169]** Ciertos aspectos y modos de realización de las composiciones y métodos aquí proporcionados incluyen el uso de combinaciones de cofactores de ligasa modificados, aceptores modificados y dadores modificados. Cualquier posible combinación de dos o más puede utilizarse. En algunos modos de realización, más de un tipo de cofactor ligasa, aceptor modificado o dador modificado puede utilizarse.

15 **[0170]** Las combinaciones de ejemplo incluyen combinaciones de dos o más cofactores ligasa modificados, aceptores modificados y dadores modificados seleccionados de los grupos según sigue: Aceptores Modificados:



donde

20 B^1 , B^2 , y B^3 se seleccionan independientemente del grupo que consiste en purina o pirimidina sustituida o no sustituida, cualquier aza o deaza derivada de las mismas y cualquier "base universal" o "base degenerada", que es preferiblemente reconocible por un ácido nucleico polimerasa o ligasa;

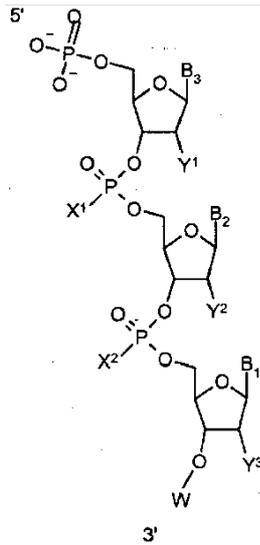
X^1 y X^2 se seleccionan independientemente del grupo que consiste en OH, SH, CH_3 y OCH_2CH_3 ;

Y^1 , Y^2 e Y^3 se selecciona cada uno independientemente del grupo que consiste en H, F, OH y OCH_3 ; y

W se selecciona de H o un residuo oligonucleótido.

Dadores modificados:

5 [0171]



donde

10 B^1 , B^2 , y B^3 se seleccionan independientemente del grupo que consiste en purina o pirimidina sustituida o no sustituida, cualquier aza o deaza derivada de la misma y cualquier "base universal" o "base degenerada", que es preferiblemente reconocible por un ácido nucleico polimerasa o ligasa;

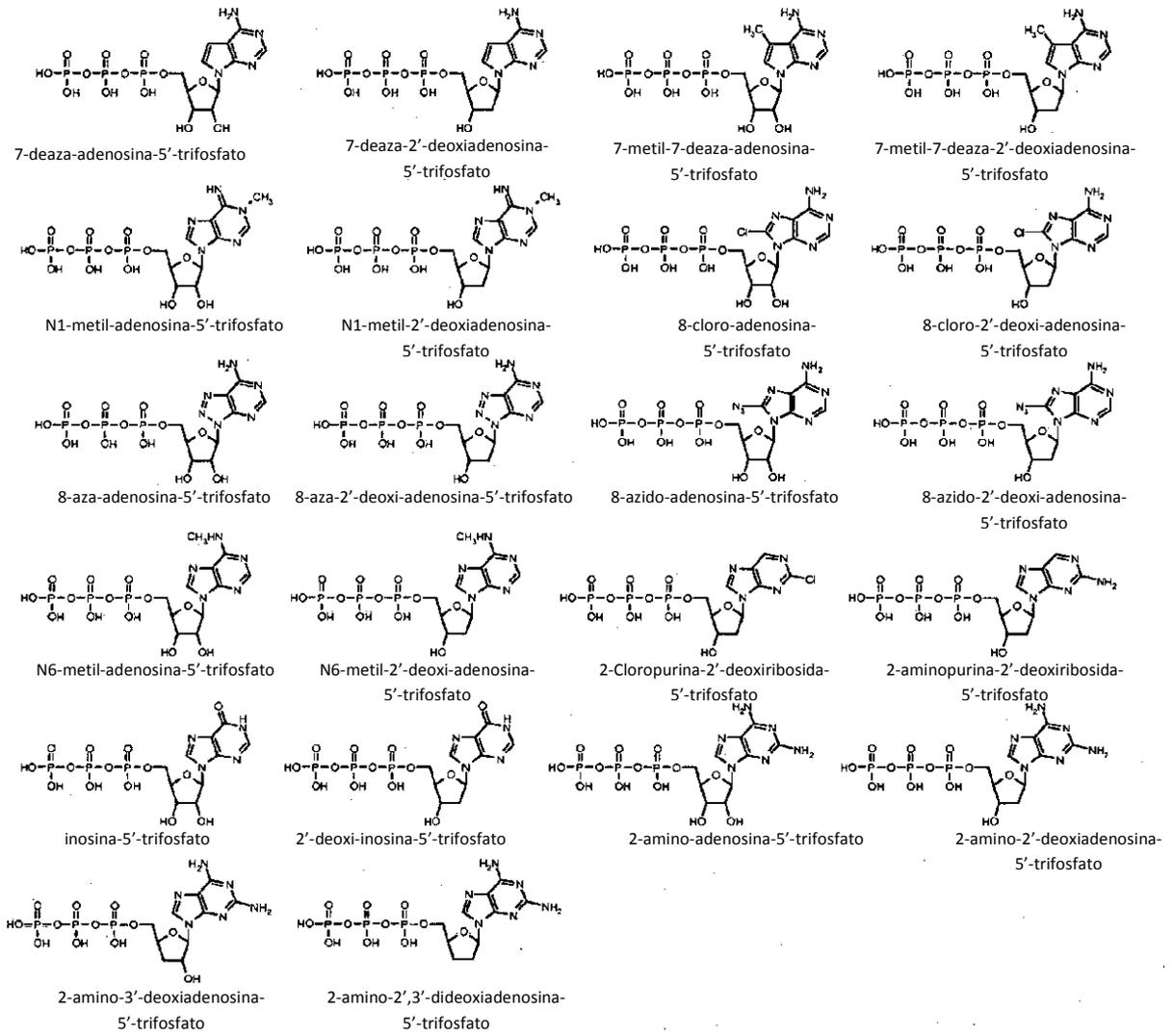
X^1 y X^2 se seleccionan independientemente del grupo que consiste en OH, SH, CH_3 y OCH_2CH_3 ;

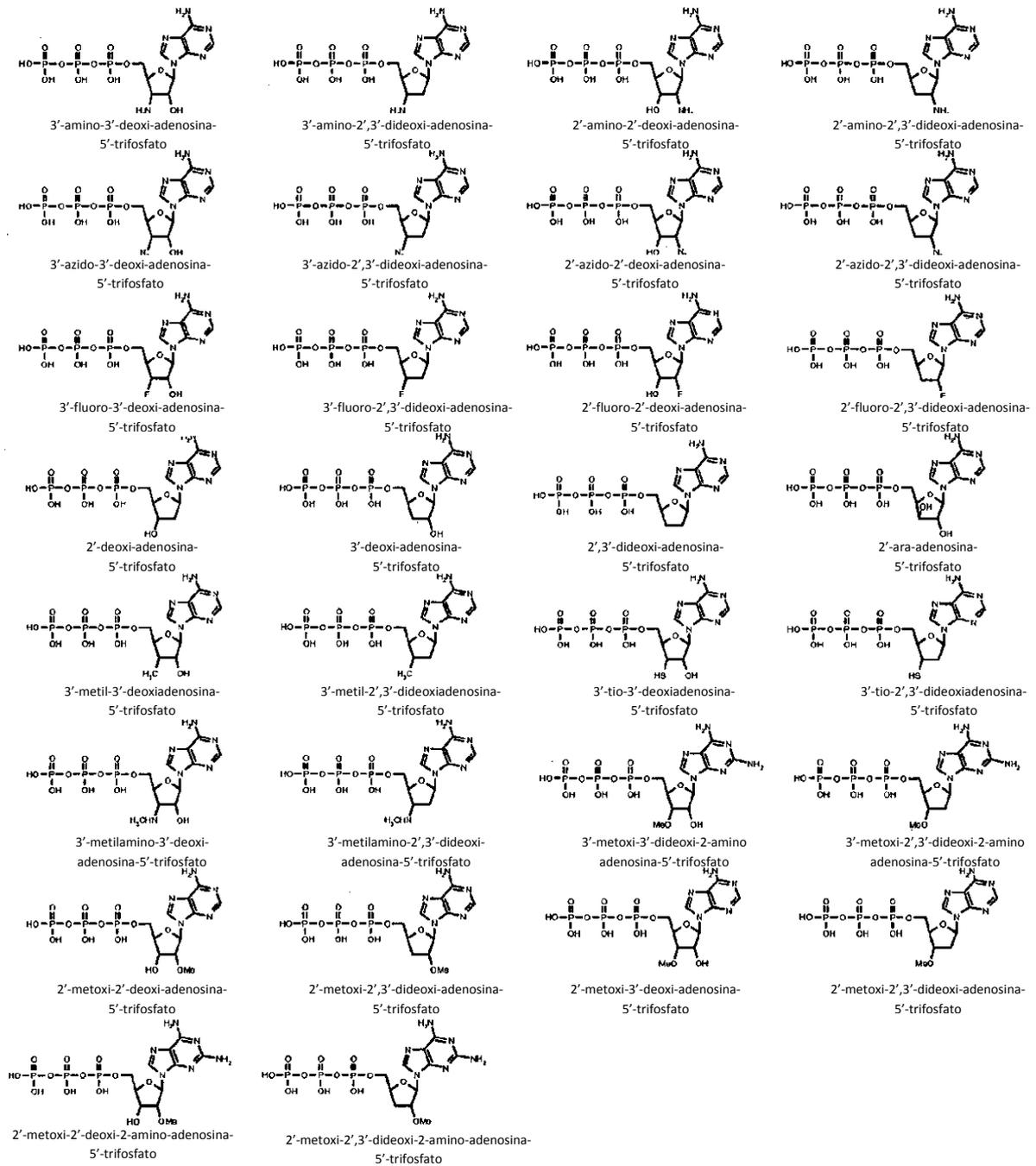
Y^1 , Y^2 e Y^3 se selecciona cada uno independientemente del grupo que consiste en H, F, OH y OCH_3 ; y

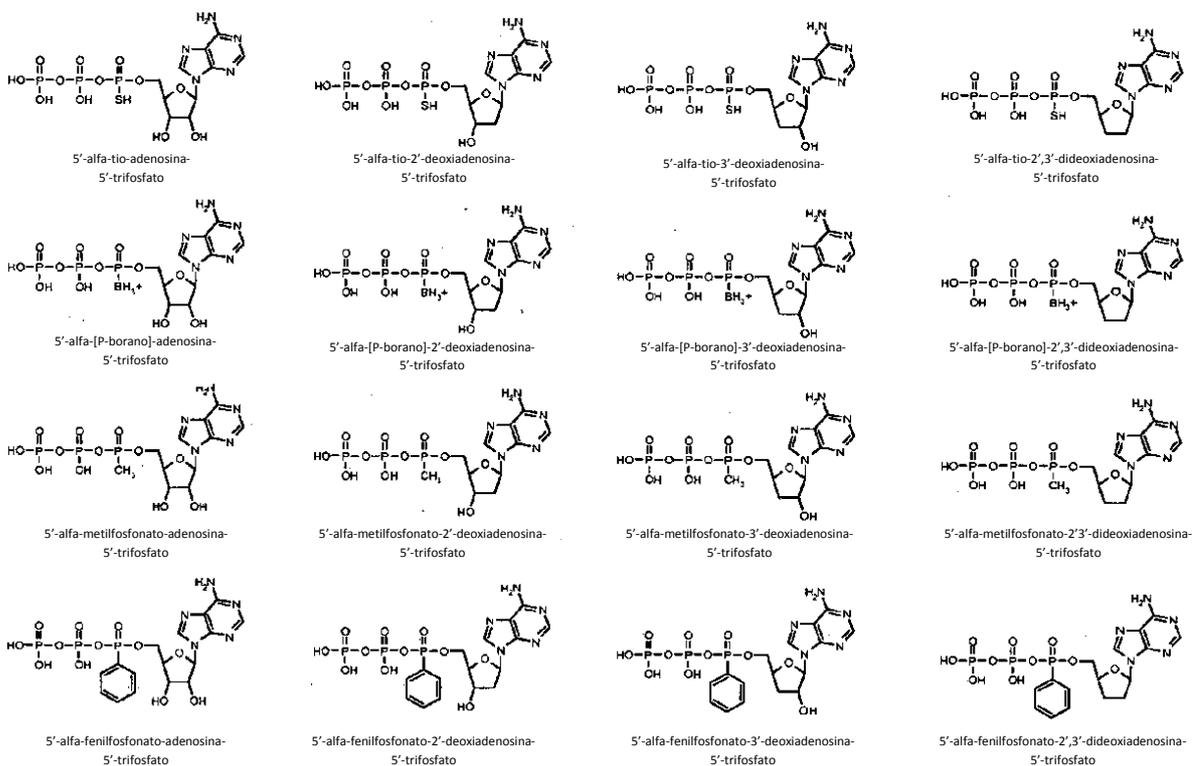
W se selecciona de H o un residuo oligonucleótido.

Cofactores modificados:

15 [0172]

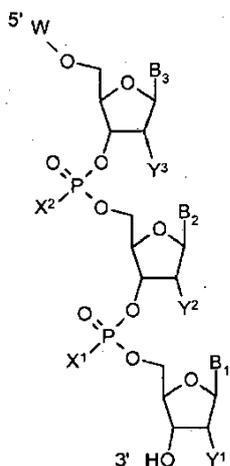






[0173] Las combinaciones particularmente preferidas de los componentes modificados de ligasa se seleccionan de los aceptores modificados, los dadores modificados y los cofactores modificados según sigue:

5 Aceptores modificados:



donde

B^1 , B^2 , y B^3 se seleccionan independientemente del grupo que consiste en purina o pirimidina sustituida o no sustituida, cualquier aza o deaza derivada de las mismas y cualquier "base universal" o "base degenerada", que es preferiblemente reconocible por un ácido nucleico polimerasa o ligasa;

X^1 se selecciona independientemente del grupo que consiste en H, OH, SH, OCH_2CH_3 y CH_3 ;

X^2 se selecciona independientemente del grupo que consiste en H, OH, SH, OCH_2CH_3 y CH_3 ;

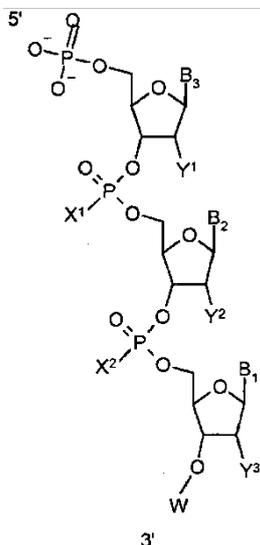
Y^1 , Y^2 e Y^3 se selecciona cada uno independientemente del grupo que consiste en H y OCH_3 ; y

10

W se selecciona de H o un residuo oligonucleótido.

Dadores Modificados:

[0174]



5 donde

B¹, B², y B³ se seleccionan independientemente del grupo que consiste en purina o pirimidina sustituida o no sustituida, cualquier aza o deaza derivada de la misma y cualquier "base universal" o "base degenerada", que es preferiblemente reconocible por un ácido nucleico polimerasa o ligasa;

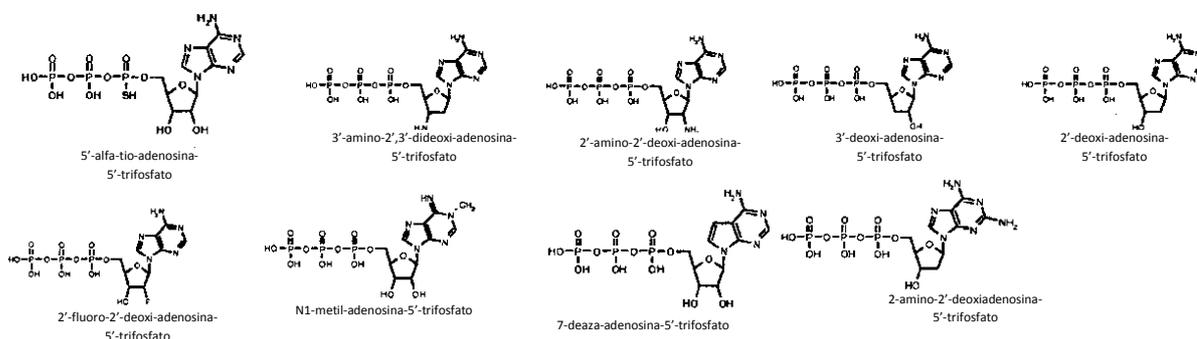
X¹ y X² se selecciona independientemente del grupo que consiste en H, OH, SH, OCH₂CH₃ y CH₃;

10 Y¹, Y² e Y³ se selecciona cada uno independientemente del grupo que consiste en H y OCH₃; y

W se selecciona de H o un residuo oligonucleótido.

Cofactores Modificados:

[0175]



15 [0176] En un aspecto, los métodos y composiciones aquí presentados proporcionan componentes de ligasa modificados. En algunos modos de realización, los componentes de ligasa modificados pueden tener sólo un grupo de sustitución. En otros modos de realización, los componentes de ligasa modificados pueden tener más de un grupo de sustitución como modificaciones en la base, la cadena de trifosfato, azúcar, o combinaciones de los mismos. En otros modos de realización, los componentes de ligasa modificados pueden tener más de

20 un tipo de grupo de sustitución. Los componentes de ligasa modificados pueden tener la fórmula química de las Fórmulas I-III aquí descritas.

[0177] En otro aspecto, se proporcionan aquí métodos de síntesis de los componentes de ligasa modificados con una estructura química según se describe en las Fórmulas I-III descritas aquí más adelante. Los grupos de

sustitución pueden integrarse en un cofactor, aceptor o dador de ligasa, mediante el uso de métodos sintéticos o enzimáticos existentes. Los componentes de ligasa modificados de los métodos y composiciones aquí proporcionados pueden sintetizarse por cualquier método conocido en la técnica. Siguiendo a la síntesis y a la purificación de los componentes de ligasa modificados, varios procedimientos diferentes pueden utilizarse para determinar la aceptabilidad de los componentes de ligasa modificados en términos de estructura y pureza. Los ejemplos de dichos procedimientos son espectroscopía de resonancia magnética nuclear, espectrometría de masas, espectroscopia de fluorescencia, espectroscopia ultravioleta, cromatografía líquida de alta eficacia. Estos procedimientos son reconocidos por aquellos especialistas en la técnica. Los métodos actuales empleados para la separación, purificación y análisis en la técnica son aplicables a los componentes de ligasa modificados de los métodos y composiciones también proporcionados aquí.

[0178] Puede utilizarse cualquier grupo de sustitución que consiga los objetivos de los métodos y composiciones aquí proporcionados. El grupo de sustitución debería ser uno que reduzca o merme la formación de producto de ligadura indeseado bajo condiciones de reacción de ligadura en las que los componentes de ligasa modificados deben emplearse.

[0179] En algunos modos de realización, los componentes de ligadura modificados mejoran la especificidad de ligadura en comparación con el componente de ligasa sin modificar correspondiente. La mejora de ligadura hace referencia a la habilidad de la ligasa para discriminar entre ácido nucleico emparejado y ácido nucleico mal emparejado. Preferiblemente, la presencia del componente de ligasa modificado reduce o evita la ligadura cuando existe un mal emparejamiento en el dador y/o aceptor en comparación con el ácido nucleico diana (p.ej., el molde). En otros modos de realización, los componentes de ligadura modificados mejoran la especificidad de ligadura mediante una eficacia disminuida de la ligadura de ácidos nucleicos diana mal emparejados (no complementarios). En modos de realización preferidos, los componentes de ligadura modificados mejoran la especificidad de ligadura mediante la disminución de la eficacia de ligadura de ácidos nucleicos con al menos un par de bases mal emparejado comparado con el ácido nucleico emparejado. En modos de realización preferidos, la ligadura con un componente de ligadura modificado mejora la especificidad de ligadura al menos un 0,1%, al menos un 0,2%, al menos un 0,5%, al menos un 1%, al menos un 2%, al menos un 3%, al menos un 4%, al menos un 5%, al menos un 6%, al menos un 7%, al menos un 8%, al menos un 9%, al menos un 10%, al menos un 15%, al menos un 20%, al menos un 25%, al menos un 30%, al menos un 40%, al menos un 50%, al menos un 60%, al menos un 70%, al menos un 80%, al menos un 90%, al menos un 100%, al menos un 150%, al menos un 200%, al menos un 300% o al menos un 400%.

[0180] En algunas reacciones de ligadura, no todas las moléculas de cofactores, aceptores y/o dadores de ligasa en la reacción de ligadura contendrán un grupo de sustitución. Preferiblemente, incluso una mezcla del cofactor de ligasa modificado y del cofactor de ligasa sin modificar mejora la eficacia y la especificidad de ligadura en una población mezclada, en comparación con no utilizar para nada los cofactores de ligasa modificados. Preferiblemente, antes de la incubación a una temperatura inicial de desnaturalización, los cofactores de ligasa modificados recuperan al menos un 25% de las moléculas de cofactor de ligasa totales, preferiblemente al menos un 50% de las moléculas de cofactor de ligasa totales, preferiblemente al menos un 75% de las moléculas de cofactor de ligasa totales, preferiblemente al menos un 90% de las moléculas de cofactor de ligasa totales, preferiblemente al menos un 95% de las moléculas de cofactor de ligasa totales, preferiblemente al menos un 98% de las moléculas de cofactor de ligasa totales, más preferiblemente al menos un 99% de las moléculas de cofactor de ligasa totales y más preferiblemente al menos un 100% de las moléculas de cofactor de ligasa totales. En otro modos de realización, dos, tres, cuatro o más tipos de moléculas de cofactor de ligasa pueden emplearse en la reacción de ligadura.

[0181] En un modo de realización, sólo un tipo de cofactores de ligasa modificados está presente en la reacción de ligadura. En otros modos de realización diferentes tipos de cofactor de ligasa modificado pueden estar presentes en la misma reacción de ligadura. En otro modo de realización dos o más tipos de cofactor de ligasa modificado pueden estar presentes en la misma reacción de ligadura. En otro modo de realización tres o más tipos de cofactor de ligasa modificado pueden estar presentes en la misma reacción de ligadura. En otro modo de realización cuatro o más tipos de cofactor de ligasa modificado pueden estar presentes en la misma reacción de ligadura.

[0182] Los métodos de ligadura ejemplares adecuados para su uso con los componentes de ligasa modificados aquí proporcionados incluyen un ensayo de ligadura de oligonucleótidos (OLA) (Landegren, U., et al., 241 Science, 1077-1080 (1988)), reacción en cadena de ligasa (LCR) (Wiedmann, M., et al., 3 Genome Biol, S51-64 (1994)), PCR mediante ligasa (LM-PCR) (Mueller, P.R., et al., 246 Science, 780-786 (1989), Pfeifer, G.P., et al., 246 Science, 810-813 (1989)), reacción de detección de ligadura PCR (PCR-LDR) (Cheng, Y.W., et al., 16 Genome Res, 282-289 (2006)), sondas candado (Antson, D., et al., 28 Nucleic Acids Res, e58 (2000)), ensayo de ligadura de oligonucleótido PCR (PCR-OLA) (Delahunty, C., et al., 58 Am J Hum Genet, 1239-1246 (1996)), enfoque de gap LCR (Abravaya, K., et al., 23 Nucleic Acids Res, 675-682 (1995)), SNPlex (De la Vega, F.M., et al., 573 Mutat Res, 111-135 (2005)), Livak, K.J. 14 Genet Anal, 143-149 (1999)), MLPA (amplificación de sondas dependientes de ligaduras múltiples)(Schouten, J.P., et al., 30 Nucleic Acids Res, e57 (2002)), ensayo de

genotipado GoldenGate (Fan, J.B., et al., 68 Cold Spring Harb Symp Quant Biol, 69-78 (2003), Oliphant, A., et al., Suppl Biotechniques, 56-58, 60-51 (2002), Shen, R., et al., 573 Mutat Res, 70-82 (2005)), y ensayos con sondas de inversión molecular (Fodor, S.P., et al., 251 Science, 767-773 (1991), Matsuzaki, H.S., et al., 1 Nat Methods, 109-111 (2004), Matsuzaki, H., et al., 14 Genome Res, 414-425 (2004), Pease, A.C., et al., 91 Proc Natl Acad Sci U S A, 5022-5026 (1994)), ligadura de proximidad (Gustafsdottir, S., et al., 345 Anal Biochem, 2-9 (2005), Söderberg, O., et al., 28 Genet Eng (NY), 85-93 (2007)), y la secuenciación de la siguiente generación mediante ligadura.

[0183] Los enfoques de ejemplo basados en ligadura para la detección de secuencia adecuada para su uso con los componentes de ligasa modificados proporcionados aquí incluyen aquellos descritos en Barany, F., et al., Patentes Estadounidenses Núms. 7,244,831; 6,312,892 y el uso de ligasas termoestables de alta fidelidad (Patente Estadounidense Núm. 6,949,370), acoplamiento LDR y PCR (Barany, F., et al., Patentes Estadounidenses Núms. 7,097,980; 6,797,470; 6,268,148 ; 6,027,889; 7,166,434), ligadura utilizando una endonucleasa (Barany, F., et al., Patentes Estadounidenses Núms. 7,198,894; 7,014,994), OLA/PCR (Eggerding, F., US Patent Nos. 5,912,148; 6,130,073), ligadura/amplificación (Lao, K.Q., US Patent No. 7,255,994), ligadura y división gradual (Brenner, S., et al., US Patent Nos. 5,714,330; 5,552,278), ligadura de proximidad (Gustafsdottir, S., et al., 345 Anal Biochem, 2-9 (2005), Söderberg, O., et al., 28 Genet Eng (NY), 85-93 (2007), Fredriksson, S., et al., 20 Nat Biotechnol, 473 -477 (2002)), ligadura de proximidad para la detección de patógenos (Gustafsdottir, S.M., et al., 52 Clin Chem, 1152-1160 (2006)), detección de citocinas (Gullberg, M., et al., 101 Proc Natl Acad Sci USA, 8420-8424 (2004)), detección de esporas (Pai, S., et al., 33 Nucleic Acids Res, e162 (2005)), detección de biomarcadores de cáncer (Fredriksson, S., et al., 4 Nat Methods, 327-329 (2007)), y ligadura de proximidad para medir la fortaleza de las interacciones proteína-ADN (Gustafsdottir, S., et al., 345 Anal Biochem, 2-9 (2005), Schallmeiner, E., et al., 4 Nat Methods, 135-137 (2007)).

[0184] Los ensayos de diagnóstico basados en ligadura de ejemplo adecuados para el uso con los componentes de ligasa modificados aquí proporcionados incluye la detección de variedad de VIH resistente a los fármacos (Lalonde, M., et al., 45 J Clin Microbiol, 2604-2615 (2007)) la detección multiplexada de productos específicos de alelo (Macdonald, S. J., et al., 6 Genome Biol, R105 (2005)), detección SNP mediante la ligadura incluyendo un ensayo de ligadura de oligonucleótido (OLA) (Landegren, U., et al., 241 Science, 1077-1080 (1988)), reacción en cadena de ligasa (LCR) (Wiedmann, M., et al., 3 Genome Biol, S51-64 (1994)), detección SNP utilizando combinaciones de ligadura y PCR incluyendo PCR mediante ligasa (LM-PCR) (Mueller, P.R., et al., 246 Science, 780-786 (1989), Pfeifer, G.P., et al., 246 Science, 810-813 (1989)), reacción de detección de ligadura PCR (PCR-LDR) (Cheng, Y.W., et al., 16 Genome Res, 282-289 (2006)), sondas candado (Antson, D., et al., 28 Nucleic Acids Res, e58 (2000)), ensayo de ligadura de oligonucleótido PCR (PCR-OLA) (Delahunty, C., et al., 58 Am J Hum Genet, 1239-1246 (1996)), y un enfoque gap LCR (Abravaya, K., et al., 23 Nucleic Acids Res, 675-682 (1995)), SNPlex (De la Vega, F.M., et al., 573 Mutat Res, 111-135 (2005), Livak, K.J. 14 Genet Anal, 143-149 (1999)), MLPA (amplificación de sondas dependiente de ligaduras múltiples) (Schouten, J.P., et al., 30 Nucleic Acids Res, e57 (2002)), ensayo de genotipo mediante Goldegate de Illumina (Fan, J.B., et al., 68 Cold Spring Harb Symp Quant Biol, 69-78 (2003), Oliphant, A., et al., Supl Biotécnicas, 56-58, 60-51 (2002), Shen, R., et al., 573 Mutat Res, 70-82 (2005)) y un ensayo de sonda de inversión molecular sobre los ensayos de Affymetrix GeneChip (Fodor, S.P., et al., 251 Science, 767-773 (1991), Matsuzaki, H., et al., 1 Nat Methods, 109-111 (2004), Matsuzaki, H., et al., 14 Genome Res, 414-425 (2004), Pease, A.C., et al., 91 Proc Natl Acad Sci U S A, 5022-5026 (1994)).

[0185] Ensayos de ligadura ejemplares adicionales adecuados para el uso con componentes de ligasa modificados aquí proporcionados incluyen el tradicional método dideoxi de secuenciación de Sanger (Sanger, F., et al., 74 Proc Natl Acad Sci USA, 5463-5467 (1977) y el ensayo de secuenciación de la siguiente generación como el Sistema de Secuenciación 454, el Analizador de Genoma Illumina, el servicio de secuenciación de genoma de Knome *Knome-COMLETE™* y la tecnología de secuenciación *ABI SOLiD™ System* y otros ensayos de secuenciación mediante ligadura (Ronaghi, M., 11 Genome Res, 3-11 (2001), Mirzabekov, A., 12 Trends Biotechnol, 27-32 (1994), Schmalzing, D., et al., 20 Electrophoresis, 3066-3077 (1999)).

[0186] Los métodos y composiciones aquí proporcionadas se describirán con mayor detalle mediante la referencia a los siguientes ejemplos no limitantes.

EJEMPLO 1

Detección de producción de ligadura utilizando un análisis PAGE

[0187] Los dadores y aceptores (LP3'T Aceptor c/ PBS y Com3F Dador c/ PBS, respectivamente) con secuencias de unión al cebador ("PBS") se evaluaron por su habilidad de unirse a la T4 ADN ligasa en presencia de un molde complementario (molde Alg). Cuatro escenarios experimentales se llevaron a cabo (Figura 2). Se estableció una primera mezcla de reacción de ligadura que incluía dador, aceptor, cofactor ATP, molde y no incluía ligasa. No se detectó ninguna ligadura. Una segunda mezcla de reacción de ligadura se estableció que incluía dador, aceptor, cofactor ATP, ligasa y no incluía molde. No se detectó ninguna ligadura. Una tercera

mezcla de reacción de ligadura se estableció que incluía dador, aceptor, ligasa, molde y no se añadió cofactor ATP. Se detectó una pequeña cantidad de producto ligado, que es probablemente debido a una pequeña cantidad de ligasa adenilada que se aisló durante el proceso de purificación. Una cuarta mezcla de reacción de ligadura se estableció que incluía dador, aceptor, cofactor ATP, ligasa y molde. Una mayoría de dador y aceptor se consumieron, con una conversión eficiente al producto de ligadura unido.

[0188] Cada reacción de 20 µL se llevó a cabo en un tampón que contenía 50 mM Tris-HCl (pH 7,5), 10 mM MgCl₂, 10 mM ditiotretitol, 25µg/ml albúmina del suero bovino. Se añadió 1 mM ATP al tampón de manera independiente. El dador (LP3'T c/PBS), aceptor (Com3F c/PBS), y molde (Alg) tenían 0,1 µM de cantidad equimolar. El aceptor, dador y molde se desnaturalizaron a 95°C durante 3 minutos y se recoció a 4°C durante 3 minutos. La ligadura se inició añadiendo 400 unidades de T4 ligasa (New England Biolabs) a cada reacción. La ligadura continuó a 16°C durante 20 minutos. La ligadura se acabó calentando la reacción a 65°C durante 10 minutos y añadiendo un volumen igual de tampón con 2x TBE-Urea (Invitrogen). Las muestras se realizaron con un 6% de geles TBE-Urea Novex (Invitrogen). Los geles se tintaron con tinte de ácido nucleico SYBR Gold (Invitrogen) de acuerdo con el protocolo del fabricante.

Tabla 1: Secuencias polinucleótidas del dador y el aceptor

Nombre de secuencia	Secuencia (5' → 3')
LP3'T For	TAGCGTCTTGATAGTCTCGTG
Com3F Rev	GTACCAGTCGCCTAGAATACT
LP3'T Aceptor c/ PBS	<u>TAGCGTCTTGATAGTCTCGTGCCCTGTTCCAGCGTCGGTGTTGCGTT</u>
LP3'G Aceptor c/ PBS	<u>TAGCGTCTTGATAGTCTCGTGCCCTGTTCCAGCGTCGGTGTTGCGTG</u>
LP3'C Aceptor c/ PBS	<u>TAGCGTCTTGATAGTCTCGTGCCCTGTTCCAGCGTCGGTGTTGCGTC</u>
LP3'A Aceptor c/ PBS	<u>TAGCGTCTTGATAGTCTCGTGCCCTGTTCCAGCGTCGGTGTTGCGTA</u>
Com3F Dador c/ PBS	<u>AGTTGTCATAGTTTGATCCTCTAGTCTGGGAGTATTCTAGGCGACT</u> <u>GGTAC</u>
Molde Alg	CCCAGACTAGAGGATCAAACCTATGACAACCTAACGCAACACCGCAG ACGCTGGAACAGGG
* La parte subrayada representa la secuencia de unión del cebador (PBS).	

EJEMPO 2

Detección de la producción de ligadura utilizando un análisis PCR a tiempo real

[0189] El producto de ligadura entre los polinucleótidos dador y aceptor (LP3'T Aceptor c/ PBS y Com3F Dador c/PBS, respectivamente) se eliminaron utilizando un PCR cuantitativo a tiempo real. Las reacciones de ligadura se llevaron a cabo con T4 ADN ligasa en la presencia de un molde complementario (molde Alg) y se detectó utilizando PCR a tiempo real. Las diluciones en serie del producto a partir de las reacciones de ligadura (10⁴ a 10⁹ diluciones del producto de ligadura) se utilizaron como molde en las reacciones PCR posteriores. La mezcla de reacción consistía en un tampón de 1X PCR (20 mM Tris (pH 8,4), 50 mM KCl, 1,5 mM MgCl₂), los cebadores PCR específicos para los sitios de enlace del cebador se diseñaron en el extremo 5' del aceptor (LP3'T) y en el extremo 3' del dador (Com3FRev) (0,1 µM cada uno), Taq ADN polimerasa (5U/ul) (Invitrogen), un tinte de ácido nucleico SYBR Green I (dilución 1:60,000) (Invitrogen), un tinte de referencia ROX (dilución 1:30,000) (Stratagene) en una reacción de 25 µl. Las condiciones de termociclaje fueron 95°C durante 10 minutos de desnaturalización inicial, seguidos por 40 ciclos de 95°C durante 40 segundos, 56°C durante 30 segundos, 72°C durante 1 minuto y acabó con un paso final de extensión a 72°C durante 7 minutos. Las reacciones se llevaron a cabo en el instrumento Stratagene Mx3005P® QPCR System. Según se ve en la Figura 3, cada una de las seis diluciones se detectaron utilizando funciones de amplificación (Figura 3A), con el NTC (ligadura realizada en la ausencia de molde) teniendo una curva de amplificación con un Ct significativamente retrasado. La curva de disociación (Figura 3B) reveló que todas las ligaduras realizadas en presencia del molde tuvieron la misma temperatura de fusión, con el NTC teniendo una temperatura de fusión inferior, que es probablemente debida a la extensión del Com 3F Rev a lo largo del Com3F Dador c/ PBS. Finalmente, los valores Ct se extrajeron de la curva estándar y todas las diluciones de la reacción de ligadura podrían haberse detectado con una buena linealidad (Figura 3C). Debido a su habilidad para cuantificar el ácido nucleico diana este ensayo será de gran

importancia para sacar las diferencias sutiles en la eficacia de un componente de ligadura modificado, en este ejemplo, un cofactor de ligasa modificado.

EJEMPLO 3

5 **Evaluar la discriminación de cofactores modificados entre modelos emparejados y mal emparejados utilizando un análisis PAGE**

[0190] Los análogos de ATP se compararon con el cofactor ATP natural correspondiente por su habilidad para unir moldes emparejados y mal emparejados (Figura 4). Los análogos de ATP se evaluaron por la producción de ligadura relativa en presencia de un molde emparejado (LP3'T Aceptor c/ PBS y molde Alg; par de bases T-A emparejado en el extremo 3' de la hebra del aceptor) con el rendimiento relativo cuando se utilizó un molde mal emparejado (LP3'C Aceptor c/ PBS y molde Alg; par de bases C-A mal emparejado del extremo 3' de la hebra del aceptor). Las reacciones se llevaron a cabo según se describe para el Ejemplo 1, con un cofactor de interés incluido en la reacción con una concentración de 1 mM. El sustrato ATP natural se comparó con los siguientes cofactores modificados: 7-deaza-ATP (7-deaza-adenosina-5'-trifosfato), N1-metil-ATP (N1-metil-adenosina-5'-trifosfato), 2-amino-ATP (2-amino-adenosina-5'-trifosfato), 2'-amino-2'-deoxi-ATP (2'-amino-2'-deoxiadenosina-5'-trifosfato), 3'-amino-2',3'-dideoxi-ATP (3'-amino-2',3'-dideoxi-adenosina-5'-trifosfato)(Figura 4). Todos los cofactores modificados contenían una ligadura con eficacia similar al ATP natural cuando se empleaba un molde emparejado. Sin embargo, cuando se empleaba un molde mal emparejado, el uso de los cofactores modificados daba como resultado una disminución significativa en producción de ligadura en comparación con el ATP natural.

EJEMPLO 4

20 **Determinación de número de especificidad**

[0191] Un método para determinar el rendimiento de ligadura de un componente de ligadura de interés (p.ej., cofactores de ligasa modificados, dadores modificados o aceptores modificados) se da asignando un número de especificidad. Los números de especificidad pueden determinarse por ejemplo, dividiendo la producción de ligadura de un caso emparejado entre la producción de ligadura de un caso mal emparejado donde un único par de bases difiere en relación con el caso emparejado. Las producciones de ligadura se determinaron primero mediante pruebas de densitometría de los geles PAGE según se demuestra en el Ejemplo 1. Las producciones se normalizan entonces con las lecturas del molde en la misma reacción, con la posterior normalización de la producción de ligadura incluyendo el cofactor natural (ATP), donde ATP tiene una producción normalizada de 1,0. Por ejemplo, en el caso de 2'-deoxi-ATP (2'-deoxi-adenosina-5'-trifosfato; Figura 4), la producción de ligadura en el caso emparejado (LP3'T Aceptor c/ PBS y molde Alg; par de bases T-A emparejado en el extremo 3' de la hebra del aceptor) fue 1,34. En el caso mal emparejado (LP3'C Aceptor c/ PBS y molde Alg; el par de bases C-A mal emparejado en el extremo 2' de la hebra del aceptor) fue 0,18. Por consiguiente, el número de especificidad asignado a 2'-deoxi-ATP en un caso de mal emparejamiento C-A fue $1,34 \div 0,18 = 7,44$. Un valor mayor a este es indicativo de una especificidad de ligadura mejorada. Un valor inferior a este es indicativo de una especificidad de ligadura reducida.

EJEMPLO 5

Evaluación de matriz para identificar la discriminación de un cofactor modificado entre moldes emparejados y mal emparejados

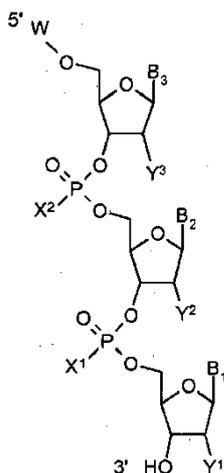
[0192] Los análogos de ATP se compararon con el cofactor ATP natural por su habilidad de unir moldes emparejados y mal emparejados para la producción de ligadura relativa en presencia de un molde emparejado (LP3'T Aceptor c/ PBS y molde Alg; par de bases T-A emparejado en el extremo 3' de la hebra de aceptor) en relación con la producción de moldes que contenían un par de bases mal emparejado en el extremo 3' del aceptor: 1) LP3'C Aceptor c/ PBS y molde Alg; C-A mal emparejado, 2) LP3'G Aceptor c/ PBS y molde Alg; G-A mal emparejado, y 3) LP3'A Aceptor c/ PBS y mole Alg; A-A mal emparejado (Figura 5). Las reacciones se llevaron a cabo según se describe para el Ejemplo 1, con un cofactor de interés incluido en la reacción de 1 mM de concentración. El cofactor ATP natural se comparó con los siguientes diez cofactores modificados: 5'-alfa-tio-adenosina-5'-trifosfato (1-tio-ATP), 2' amino-2'-deoxi-adenosina-5'-trifosfato (2'-amino-2'-deoxi-ATP), 2-Amino-2'-deoxiadenosina-5'-trifosfato (2-amino-2'-deoxi-ATP), 2'-fluoro-2'-deoxi- adenosina-5'-trifosfato (2'-fluoro-2'-deoxi-ATP), 3'-amino-2',3'-dideoxi- adenosina-5'-trifosfato (3'-amino-2',3'-dideoxi- ATP), 3'-deoxi- adenosina-5'-trifosfato (3'-deoxi-ATP), 7-deaza-adenosina-5'-trifosfato (7-deaza-ATP), 2'-deoxi-adenosina-5'-trifosfato (2'-deoxi-ATP), L-isomero-2'-deoxi-aderiosina-5'-trifosfato (L-isomero de 2'-deoxi-ATP), y N1-metil-adenosina-5'-trifosfato (N1-metil-ATP). Los resultados de la integración a partir del análisis PAGE de los rendimientos de ligadura para los cuatro pares de bases diferentes de interés: T-A, G-A, C-A, y A-A, se mostraron en una serie de gráficas de dispersión. Cada gráfica de dispersión compara la producción normalizada para un molde emparejado (T-A) con la producción normalizada para cada uno de los tres moldes diferentes mal emparejados (C-A, G-A y A-A) (Figura 5). Las modificaciones principales de interés tendrán una producción de ligadura

comparable a un ATP natural en el caso emparejado (T-A), con una baja producción de ligadura en presencia de un molde mal emparejado (C-A, G-A y A-A). A partir de este panel de análogos, 5'-alfa-tio-adenosina-5'-trifosfato, 2'-deoxi-adenosina-5'-trifosfato y 3'-amino-2',3'-dideoxi-adenosina-5'-trifosfato se identificaron como modificaciones principales de interés.

5 EJEMPLO 6

Evaluación de matriz para identificar la discriminación de un aceptor modificado entre los moldes emparejados y mal emparejados

[0193] Varias hebras de aceptor modificado de cadena principal y de azúcar se compararon con la hebra de aceptor natural sin modificar por su habilidad de unir moldes emparejados y mal emparejados. Las hebras de aceptor modificado se evaluaron por la producción de ligadura relativa en presencia del molde emparejado (LP3'T Aceptor c/PBS y molde Alg; par de bases T-A emparejado en el extremo 3' del aceptor) relativo a la producción de moldes que contenían un par de bases mal emparejado en el extremo 3' del molde: 1) LP3'T Aceptor c/ PBS y molde Glg; T-G mal emparejado, 2) LP3'T Aceptor c/ PBS y molde Clg; T-C mal emparejado, y 3) LP3'T Aceptor c/ PBS y molde Tlg; T-T mal emparejado. Las reacciones se llevaron a cabo según se describe en el Ejemplo 1 utilizando T4 ADN ligasa y con la hebra de aceptor de interés incluida en la reacción en una concentración 1 μ M. Se llevaron a cabo experimentos adicionales con *E. coli* ligasa, una ligasa que depende de NAD (no mostrada) en la que el resultado de la hebra de aceptor natural se comparó con diez aceptores modificados con la fórmula que se muestra abajo:



20 donde:

X^1 y X^2 se seleccionan cada uno independientemente del grupo que consiste en OH, SH, y CH_3 , y

Y^1 , Y^2 y Y^3 se seleccionan cada uno independientemente del grupo que consiste en H, F y OCH_3 ; y

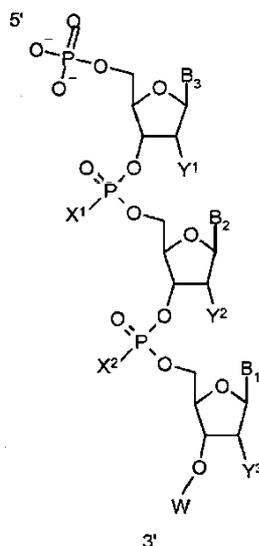
W es un residuo oligonucleótido.

[0194] En el aceptor natural, X^1 y X^2 son OH e Y^1 , Y^2 e Y^3 son H (Figura 6, sin modificación). Cada uno de los diez aceptores modificados tiene una modificación en uno de los sitios X^1 , X^2 , Y^1 , Y^2 , o Y^3 relativa al aceptor natural para que X^1 sea SH o CH_3 (Figura 6, PS (X^1) y PMe (X^1), respectivamente), X^2 sea SH o CH_3 (Figura 6, PS (X^2) y PMe (X^2), respectivamente), Y^1 sea F o OCH_3 (Figura 6, 2'-F (Y^1) o 2'-OMe (Y^1), respectivamente), Y^2 sea F o OCH_3 (Figura 6, 2'-F (Y^2) o 2'-OMe (Y^2), respectivamente), y Y^3 sea F o OCH_3 (Figura 6, 2'-F (Y^3) o 2'-OMe (Y^3), respectivamente).

[0195] Las producciones de ligadura, determinadas por el análisis de gel PAGE, para los cuatro pares de bases diferentes de interés: T-A, T-G, T-C, and T-T, se mostraron en una serie de tres gráficas de dispersión. Cada gráfica de dispersión comparaba la producción normalizada para un molde emparejado (T-A) con la producción normalizada de cada uno de los tres moldes diferentes mal emparejados (T-G, T-C, and T-T) (Figura 6). Las modificaciones principales de interés tendrán una producción de ligadura comparable con un ATP en el caso emparejado (T-A), con una producción de ligadura baja en presencia de un molde mal emparejado (T-G, T-C y T-T). A partir de este panel, los aceptores modificados, la modificación CH_3 en la posición X^1 (Figura 6, PMe (X^1)) y la modificación OCH_3 en la posición Y^2 (Figura 6, 2'-OMe (Y^2)) se identificaron como las modificaciones de aceptor principal de interés.

EJEMPLO 7**Evaluación de matriz para identificar la discriminación de un dador modificado entre los moldes emparejados y mal emparejados**

[0196] Varias hebras de dador modificado de cadena principal y de azúcar se compararon con la hebra de dador natural por su habilidad para unir los modelos emparejados y mal emparejados. Las hebras de dador modificado se evaluaron por la producción de ligadura relativa en presencia del molde emparejado (Com3F Dador c/PBS, LP3'T Aceptor c/PBS y molde Alg; T-A par de bases emparejado en el extremo 3' de la hebra de aceptor) en relación con la producción de moldes que contienen un par de bases mal emparejado en el extremo 3' del molde: 1) Com3F Dador c/ PBS, LP3'T Aceptor c/PBS, y modelo Clg; T-C mal emparejado y 2) Com3F c/PBS, LP3'C c/PBS, y Alg; C-A mal emparejado. Las reacciones se elaboraron según se describe en el ejemplo 1 con T4 ADN ligasa y la hebra del dador de interés incluida en cada reacción con una concentración de 1 μ M. Se realizaron otros experimentos con *E. coli* ligasa, una ligasa dependiente de NAD (no mostrada). La hebra de dador natural se comparó con los siguientes cinco dadores modificados:



15 donde X^1 y X^2 se sustituyen independientemente con OH o CH_3 , e Y^1 , Y^2 , e Y^3 se sustituyen independientemente con H o OCH_3 .

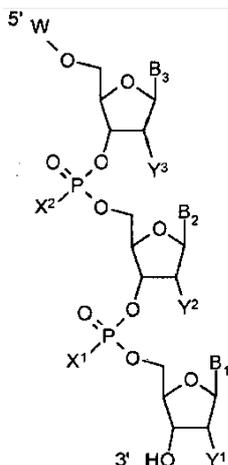
[0197] En el dador natural, X^1 y X^2 son OH e Y^1 , Y^2 , e Y^3 son H (Figura 7, sin modificación). Cada uno de los cinco dadores modificados tiene una modificación en uno de los sitios X^1 , X^2 , Y^1 , Y^2 , o Y^3 relativos al dador natural como X^1 es CH_3 (Figura 7, PMe (X^1)), X^2 es CH_3 (Figura 7, PMe (X^2)), Y^1 es OCH_3 (Figura 7, 2'-OMe (Y^1)), Y^2 es OCH_3 (Figura 7, 2'-OMe (Y^2)), o Y^3 es OCH_3 (Figura 7, 2'-OMe (Y^3)).

[0198] Las producciones de ligadura normalizadas se determinaron a partir del análisis de gel PAGE para tres pares de bases diferentes de interés: TA, T-C y C-A, se mostraron en una serie de tres gráficas de dispersión. Cada gráfica de dispersión comparaba un molde emparejado (T-A) con cada uno de los tres modelos diferentes mal emparejados (T-C y C-A) (Figura 7). Las modificaciones principales de interés tendrán una producción de ligadura comparable con el ATP en el caso emparejado (T-A) con una producción de ligadura baja en presencia de un caso mal emparejado (T-C y C-A). A partir de este panel de aceptores modificados, la modificación CH_3 en las posiciones X^1 (PMe X^1) y X^2 (PMe X^2) se identificaron como las modificaciones principales de dador de interés.

EJEMPLO 8**Evaluación para identificar un aceptor modificado en combinación con un cofactor ATP modificado que discrimina mejor entre moldes emparejados y mal emparejados**

[0199] Continuando con los estudios mostrados en los ejemplos 1, 3, 4 y 5, un número de hebras de aceptor modificado de cadena principal y de azúcar en combinación con varios cofactores ATP modificados se compararon con la hebra de aceptor natural y ATP por su habilidad para unir moldes emparejados en comparación con moldes mal emparejados. Estos estudios evaluaron la combinación de hebras de aceptor modificado con cofactores ATP modificados para el rendimiento de ligadura relativo en presencia de un molde emparejado (Com3F Dador c/PBS, LP3'T Aceptor c/PBS y molde Alg; par de bases T-A emparejado en el

extremo 3' de la hebra del aceptor) con el rendimiento relativo cuando se empleaba un molde único que contenía un par de bases mal emparejado en el extremo 3' de la hebra del molde: 1) Com3F Dador c/ PBS, LP3'T Aceptor c/PBS, y molde Clg; T-C mal emparejado. Las reacciones se llevaron a cabo según se describió en el Ejemplo 1 con la hebra del aceptor de interés incluida en cada reacción con una concentración 1 μ M y el cofactor ATP en una concentración de 1 mM. En estos estudios, la realización de la hebra de aceptor natural se comparó con los siguientes cinco aceptores modificados:



donde X^1 se selecciona independientemente del grupo que consiste en OH, SH y CH_3 , y X^2 se selecciona independientemente del grupo que consiste en OH y CH_3 , e Y^1 e Y^2 se seleccionan cada uno independientemente del grupo que consiste en H y OCH_3 .

[0200] En el aceptor natural (Figura 8, sin modificación), X^1 y X^2 son OH e Y^1 e Y^2 son H. Cada uno de los cinco aceptores modificados tiene una modificación en uno de los sitios X^1 , X^2 , Y^1 , o Y^2 relativo al aceptor natural para que X^1 sea SH (Figura 8, PS (X^1)), X^1 sea CH_3 (Figura 8, PMe (X^1)), X^2 sea CH_3 (Figura 8, PMe (X^2)), Y^1 sea OCH_3 (Figura 8, 2'-Ome (Y^1)) o Y^2 sea OCH_3 (Figura 8, 2'-Ome (Y^2)).

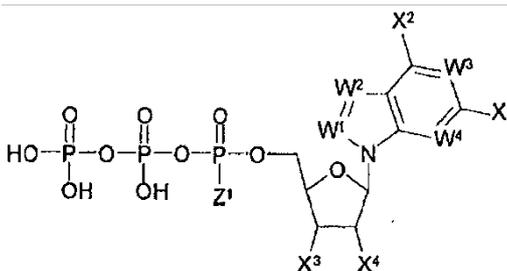
[0201] Estas cinco hebras de aceptor modificado se analizaron en combinación con seis análogos ATP modificados incluyendo: 2'-deoxi-ATP (2'-deoxi-adenosina-5'-trifosfato), 1-tio-ATP (5'-alfa-tio-adenosina-5'-trifosfato), 2-amino-2'-deoxi-ATP (2'-deoxi-adenosina-5'-trifosfato), 2-amino-ATP (2-amino-adenosina-5'-trifosfato), 3'-amino-2', 3'-dideoxi-ATP (3'-amino-2',3'-dideoxi-adenosina-5'-trifosfato) y 2-amino-2'-deoxi-ATP (2-amino-2'-deoxi-adenosina-5'-trifosfato). Se probaron todas las combinaciones posibles de análogos ATP y hebras de aceptor modificado.

[0202] Las producciones de ligadura (normalizadas a ATP), determinadas a partir del análisis de gel PAGE, para dos pares de bases diferentes de interés: T-A y T-C, se registraron en una gráfica (figura 8). Las gráficas incluyen producciones de ligadura relativa utilizando hebras de cadena principal y de azúcar del aceptor modificado en combinación con diferentes cofactores ATP modificados. Estos valores son relativos a las producciones de ligadura utilizando hebras de aceptor natural y ATP con pares de bases emparejados (T-A) y mal emparejados (T-C) en el extremo 3' de la hebra del aceptor, según se describe en el ejemplo 1. En el caso emparejado (T-A), los valores en celdas sombreadas con puntos representan una producción de ligadura relativa mayor a 0,85, los valores en las celdas sin sombrear representan una producción de ligadura relativa entre 0,70-0,85 y los valores en las celdas sombreadas en gris representan una producción de ligadura relativa entre 0-0,70. En el caso mal emparejado (T-C), las celdas sombreadas con puntos representan una producción de ligadura relativa entre 0-0,1, las celdas sin sombrear representan una producción de ligadura relativa entre 0,01-0,1 y las celdas grises representan una producción relativa de ligadura entre 0,10-1,00. Todas las producciones presentadas se normalizaron en la combinación ATP con una hebra de aceptor sin modificar. Las combinaciones con criterios de elaboración preferidos tienen una producción relativa mayor a 0,85 en el caso emparejado (T-A) (p.ej., las celdas sombreadas con puntos en la Figura 8, gráfica superior) y una producción de ligadura relativa menor a 0,01 en presencia de un molde mal emparejado (T-C) (p.ej., las celdas sombreadas con puntos en la Figura 8, gráfico inferior). A partir de estas posibles combinaciones, una modificación CH_3 en la posición X^1 (Figura 8, PMe (X^1)) con 3'-amino-2',3'-dideoxi-ATP (3'-amino-2',3'-dideoxi-adenosina-5'-trifosfato) se identificó como el cofactor modificado principal y la combinación de aceptor modificado de interés, con una producción de emparejamientos de 1,22 y una producción de malos emparejamientos de 0,00.

[0203] A no ser que se defina lo contrario, todos los términos técnicos y científicos utilizados aquí tienen el mismo significado que se entiende comúnmente por alguien con un conocimiento general de la técnica a la que esta invención hace referencia.

Reivindicaciones

1. Un método para detectar una mutación en un ácido nucleico diana, dicho método comprendiendo: incubar dicho ácido nucleico diana en una mezcla de reacción comprendiendo una ligasa de ácido nucleico dependiente de un cofactor, un cofactor de ligasa ATP modificado, un polinucleótido dador y un polinucleótido aceptor, en el que uno o más de dichos cofactores de ligasa ATP, polinucleótido dador y polinucleótido aceptor están modificados; y supervisar la ligadura de los polinucleótidos dador y aceptor, donde la cantidad de ligadura es indicativa de la presencia o la ausencia de la mutación y donde la presencia del cofactor de ligasa ATP modificado mejora la especificidad de ligadura en relación con el cofactor de ligasa ATP no modificado correspondiente.
2. Un método de acuerdo con la reivindicación 1, en el que el polinucleótido dador tiene la fórmula 5'-fosfato-X_(n1)-Y_(n2)-Z_(n3)-3' y el polinucleótido aceptor tiene la fórmula 5'-D_(n4)-E_(n5)-F_(n6)-hidroxi-3', donde (n2), (n3), (n4) y (n5) son cada uno independientemente 0 o cualquier entero positivo, donde (n1) y (n6) son cada uno independientemente 0, 1, 2, 3 o 4, donde X, Z, D y F son posiciones de nucleótidos complementarios al ácido nucleico diana, donde al menos uno de entre Y o E es una posición de nucleótido de interés.
3. Un método de acuerdo con las reivindicaciones 1 o 2, donde la presencia de un cofactor de ligasa ATP modificado reduce o inhibe la ligadura del ácido nucleico no complementario en relación con la ligadura del ácido nucleico complementario.
4. Un método de acuerdo con cualquier reivindicación precedente, donde la presencia de un cofactor de ligasa ATP modificado, un aceptor modificado o un dador modificado aumenta la especificidad de ligadura cuando tanto el extremo 3' del aceptor como el extremo 5' de dador están emparejados al ácido nucleico diana en comparación con cuando el extremo 3' del aceptor o el extremo 5' del dador comprende un nucleótido mal emparejado en relación con el ácido nucleico diana.
5. Un método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones de la 1 a la 3, donde la presencia de un cofactor de ligasa ATP modificado, un aceptor modificado o un dador modificado inhibe o reduce la ligadura de un ácido nucleico mal emparejado; y tiene al menos aproximadamente la misma eficacia de ligadura del ácido nucleico emparejado en comparación con un cofactor, aceptor o dador no modificado.
6. Un método de acuerdo con cualquier reivindicación precedente, donde existe al menos un par de bases mal emparejado en 10 bases en cada lado de la unión de ligadura.
7. Un método de acuerdo con cualquier reivindicación precedente, donde la ligasa es una ADN ligasa o una ARN ligasa dependiente de un molde.
8. Un método de acuerdo con cualquier reivindicación precedente, donde la ligadura comprende uno o más métodos de ligadura enzimática seleccionados del grupo que consiste en: ensayo por ligadura de oligonucleótidos (OLA), reacción en cadena por ligasa (LCR), PCR mediada por ligasa (LM-PCR), reacción PCR de detección de ligadura (PCR-LDR), sondas candado (Padlock), ensayo de ligadura de oligonucleótidos PCR (PCR-OLA), técnica LCR tipo Gap, SNPlex, MLPA (amplificación múltiple de sonda dependiente de las ligaduras), ensayo de genotipado GoldenGate y ensayo por sonda de inversión molecular, ligadura de proximidad y secuenciación de nueva generación mediante ligadura.
9. Un método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones anteriores, donde al menos un cofactor de ligasa ATP modificado tiene la estructura de la fórmula IA:



donde: W¹, W², W³ y W⁴ se selecciona cada uno independientemente del grupo que consiste en N, CR¹, y N⁺R¹;

cada R^1 se selecciona independientemente del grupo que consiste en H, F, Cl, Br, I, OR^2 , SR^2 , SeR^2 , NR^2R^3 , N_3 , $C(Y)R^4$, alquil, alquenil, alquinil, aril y aralquil sustituidos o no sustituidos, donde cualquier sustituyente puede cada uno contener opcionalmente uno o más heteroátomos;

5 Z^1 se selecciona del grupo que consiste en H, F, R^2 , OR^2 , SR^2 , SeR^2 , NR^2R^3 , NR^2OR^2 , $NR^2-NR^2R^3$, CN, N_3 , $(BH_3)^-M^+$ y $C(Y)R^4$;

M^+ es un catión;

10 cada R^2 y cada R^3 se selecciona independientemente del grupo que consiste en H o alquil, alquenil, alquinil, aril y aralquil sustituidos o no sustituidos, donde cualquier sustituyente puede cada uno contener opcionalmente uno o más heteroátomos;

15 cada R^4 se selecciona del grupo que consiste en H, F, Cl, Br, OR^2 , SR^2 , SeR^2 , NR^2R^3 , $C(Y)R^2$ y alquil, alquenil, alquinil, aril y aralquil sustituidos o no sustituidos, donde cualquier sustituyente puede cada uno contener opcionalmente uno o más heteroátomos;

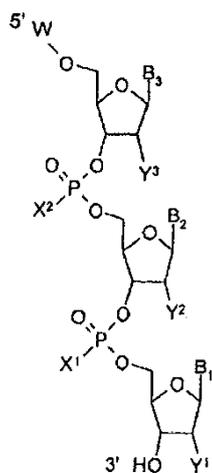
cada Y se selecciona del grupo que consiste en O, S, Se, CR^1R^1 y NR^1 ; y

20 X^1 , X^2 , X^3 y X^4 se seleccionan independientemente del grupo que consiste en R^1 , NR^2OR^2 , $NR^2-NR^2R^3$, CN, N_3 , NO, NO_2 , NCO, NCS, OCN, SCN y SSR^2 .

10. Un método de acuerdo con cualquier reivindicación precedente, donde el cofactor de ligasa ATP modificado se selecciona del grupo que consiste en 7-deaza-adenosina-5'-trifosfato, 7-deaza-2'-deoxiadenosina-5'-trifosfato, 7-metil-7-deaza-adenosina-5'-trifosfato, 7-metil-7-deaza-2'-deoxiadenosina-5'-trifosfato, N1-metil-adenosina-5'-trifosfato, N1-metil-2'-deoxiadenosina-5'-trifosfato, 8-cloro-adenosina-5'-trifosfato, 8-cloro-2'-deoxi-adenosina-5'-trifosfato, 8-aza-adenosina-5'-trifosfato, 8-aza-2'-deoxi-adenosina-5'-trifosfato, 8-azido-adenosina-5'-trifosfato, 8-azido-2'-deoxi-adenosina-5'-trifosfato, N6-metil-adenosina-5'-trifosfato, N6-metil-2'-deoxi-adenosina-5'-trifosfato, 2-Cloropurina-2'-deoxiribosida-5'-trifosfato, 2-aminopurine-2'-deoxiribosida-5'-trifosfato, inosina-5'-trifosfato, 2'-deoxi-inosina-5'-trifosfato, 2-amino-adenosina-5'-trifosfato, 2-amino-2'-deoxiadenosina-5'-trifosfato, 2-amino-3'-deoxiadenosina-5'-trifosfato, 2-amino-2',3'-dideoxiadenosina-5'-trifosfato, 5'-alfa-thio-adenosina-5'-trifosfato, 5'-alfa-thio-2'-deoxiadenosina-5'-trifosfato, 5'-alfa-thio-3'-deoxiadenosina-5'-trifosfato, 5'-alfa-thio-2',3'-dideoxiadenosina-5'-trifosfato, 5'-alfa-[P-borano]-adenosina-5'-trifosfato, y 5'-alfa-[P-borano]-2'-deoxiadenosina-5'-trifosfato, 5'-alfa-[P-borano]-3'-deoxiadenosina-5'-trifosfato, 5'-alfa-[P-borano]-2',3'-dideoxiadenosina-5'-trifosfato, 5'-alfa-metilfosfonate-adenosina-5'-trifosfato, 5'-alfa-metilfosfonate-2'-deoxiadenosina-5'-trifosfato, 5'-alfa-metilfosfonate-3'-deoxiadenosina-5'-trifosfato, 5'-alfa-metilfosfonate-2',3'-dideoxiadenosina-5'-trifosfato, 5'-alfa-fenilfosfonate-adenosina-5'-trifosfato, 5'-alfa-fenilfosfonate-2'-deoxiadenosina-5'-trifosfato, 5'-alfa-fenilfosfonate-3'-deoxiadenosina-5'-trifosfato, 5'-alfa-fenilfosfonate-2',3'-dideoxiadenosina-5'-trifosfato, 3'-amino-3'-deoxi-adenosine-5'-trifosfato, 3'-amino-2',3'-dideoxi-adenosina-5'-trifosfato, 2-amino-2'-deoxi-adenosina-5'-trifosfato, 2'-amino-2',3'-dideoxi-adenosina-5'-trifosfato, 3'-azido-3'-deoxi-adenosina-5'-trifosfato, 3-azido-2',3'-dideoxi-adenosina-5'-trifosfato, 2-azido-2'-deoxi-adenosina-5'-trifosfato, 2'-azido-2',3'-dideoxi-adenosina-5'-trifosfato, 3'-fluoro-3'-deoxi-adenosina-5'-trifosfato, 3'-fluoro-2',3'-dideoxi-adenosina-5'-trifosfato, 2'-fluoro-2'-deoxi-adenosina-5'-trifosfato, 2'-uoro-2',3'-dideoxi-adenosina-5'-trifosfato, 2'-deoxi-adenosina-5'-trifosfato, 3'-deoxi-adenosina-5'-trifosfato, 2',3'-dideoxi-adenosina-5'-trifosfato, 2-ara-adenosina-5'-trifosfato, 3'-metil-3'-deoxiadenosina-5'-trifosfato, 3'-metil-2',3'-dideoxiadenosina-5'-trifosfato, 3'-thio-3'-deoxiadenosina-5'-trifosfato, 3'-thio-2',3'-dideoxiadenosina-5'-trifosfato, 3'-metilamino-3'-deoxi adenosina-5'-trifosfato, 3'-metilamino-2',3'-dideoxi adenosina-5'-trifosfato, 3-metoxi-3'-deoxi-2-amino-adenosina-5'-trifosfato, 3'-metoxi-2',3'-dideoxi-2'-amino-adenosina-5'-trifosfato, 2-metoxi-2'-deoxi-adenosina-5'-trifosfato, 2'-metoxi-2',3'-dideoxi-adenosina-5'-trifosfato, 3'-metoxi-3'-deoxi-adenosina-5'-trifosfato, 3'-metoxi-2',3'-dideoxi-adenosina-5'-trifosfato, 2'-metoxi-2'-deoxi-2-amino-adenosina-5'-trifosfato, y 2'-metoxi-2',3'-dideoxi-2-amino-adenosina-5'-trifosfato.

55 11. Un método de acuerdo con cualquier reivindicación precedente, comprendiendo además al menos un aceptor modificado añadido a la reacción de ligadura.

60 12. Procedimiento de acuerdo con la reivindicación 11, para la detección de una mutación en un ácido nucleico diana, dicho método comprendiendo: incubar dicho ácido nucleico diana en un mezcla de reacción comprendiendo una ligasa de ácido nucleico dependiente de un cofactor, un cofactor de ligasa ATP, un polinucleótido dador y un polinucleótido aceptor modificado, donde el al menos un aceptor modificado tiene la estructura de la Fórmula II:



donde:

5 cada B¹, B² y B³ se selecciona independientemente del grupo que consiste en una purina o una pirimidina sustituida o no sustituida, cualquier derivado aza o deaza de las mismas y cualquier "base universal" o "base degenerada", que es preferiblemente reconocible por una polimerasa o ligasa de ácido nucleico;

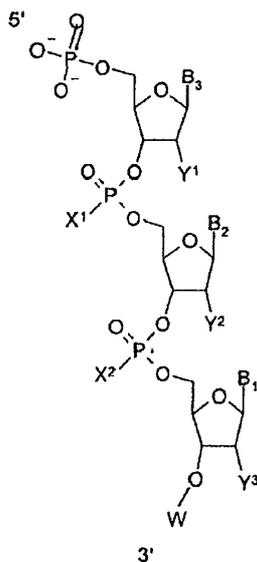
cada X¹ y X² se selecciona independientemente del grupo que consiste en OH, SH, CH₃ y OCH₂CH₃;

10 cada Y¹, Y² e Y³ se selecciona independientemente del grupo que consiste en H, F, OH, and OCH₃; y W se selecciona de H o un residuo oligonucleótido,

15 y supervisar la ligadura de los polinucleótidos dador y aceptor, donde la cantidad de ligadura es indicativa de la presencia o ausencia de la mutación.

13. Un método de acuerdo con cualquier reivindicación precedente, comprendiendo además al menos un dador modificado añadido a la reacción de ligadura.

14. Un método de acuerdo con la reivindicación 11, para detectar una mutación en un ácido nucleico diana, dicho método comprendiendo incubar dicho ácido nucleico diana en una mezcla de reacción comprendiendo una ligasa de ácido nucleico dependiente de un cofactor, un cofactor de ATP ligasa, un polinucleótido dador modificado y un polinucleótido aceptor, donde el al menos un dador modificado tiene la estructura de la Fórmula III:



25 donde:

cada B¹, B² y B³ se selecciona independientemente del grupo que consiste en purina o pirimidina sustituida o no sustituida, cualquier derivado aza o deaza de las mismas y cualquier "base universal" o

“base degenerada”, que es preferiblemente reconocible mediante una polimerasa o ligasa de ácido nucleico;

cada X¹ y X² se selecciona independientemente del grupo que consiste en OH, SH, CH₃ y OCH₂CH₃;

cada Y¹, Y² e Y³ se selecciona independientemente del grupo que consiste en H, OH y OCH₃; y

W se selecciona de H o un residuo oligonucleótido,

y supervisar la ligadura de los polinucleótidos dador y aceptor, donde la cantidad de ligadura es indicativa de la presencia o ausencia de la mutación.

15. Un método de acuerdo con la reivindicación 12, comprendiendo además al menos un dador modificado añadido a la reacción de ligadura.

16. Un método de acuerdo con la reivindicación 14, comprendiendo además al menos un dador modificado añadido a la reacción de ligadura.

17. Un método de acuerdo con cualquier reivindicación precedente, donde el cofactor de ATP ligasa modificado se selecciona del grupo que consiste en 2'-deoxi-adenosina-5'-trifosfato, 3'-deoxi-adenosina-5'-trifosfato, 2'-metoxi-2'-deoxi-adenosina-5'-trifosfato, 2'-amino-2'-deoxi-adenosina-5'-trifosfato, 2'-azido-2'-deoxi-adenosina-5'-trifosfato, 2'-fluoro-2'-deoxi-adenosina-5'-trifosfato, 2'-metoxi-2'-deoxi-2-amino-adenosina-5'-trifosfato, 2',3'-dideoxi-adenosina-5'-trifosfato, 2-amino-2'-deoxiadenosina-5'-trifosfato, 8-chloro-2'-deoxi-adenosina-5'-trifosfato, N6-metil-2'-deoxi-adenosina-5'-trifosfato, 7-deaza-2'-deoxiadenosina-5'-trifosfato, 2-Chloropurine-2'-deoxiribosida-5'-trifosfato y 2-aminopurine-2'-deoxiribosida-5'-trifosfato.

18. Un método de acuerdo con cualquier reivindicación precedente, donde el cofactor de ATP ligasa modificado se selecciona del grupo que consiste en 3'-amino-2',3'-dideoxi-adenosina-5'-trifosfato, 3'-azido-3'-deoxi-adenosina-5'-trifosfato, 3'-fluoro-3'-deoxi-adenosina-5'-trifosfato, 3'-fluoro-2',3'-dideoxi-adenosina-5'-trifosfato, 3'-metoxi-3'-deoxi-adenosina-5'-trifosfato and 2'-amino-2',3'-dideoxi-adenosina-5'-trifosfato.

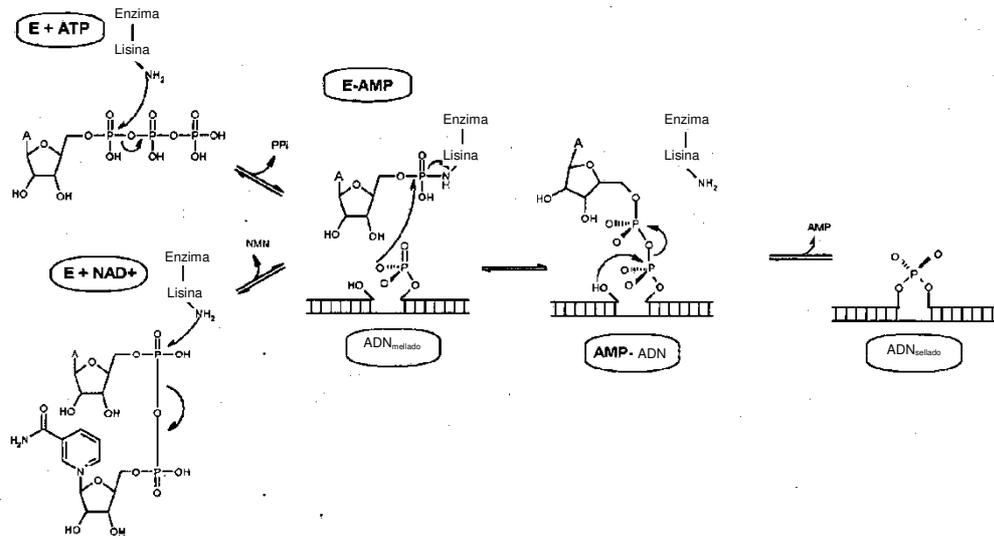


Figura 1

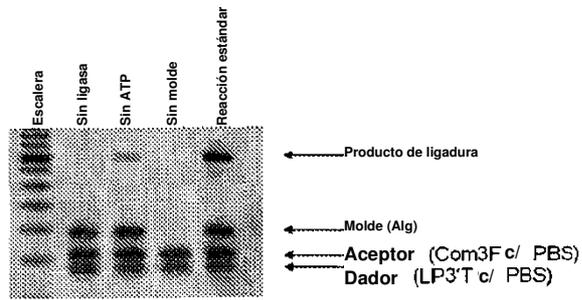


Figura 2

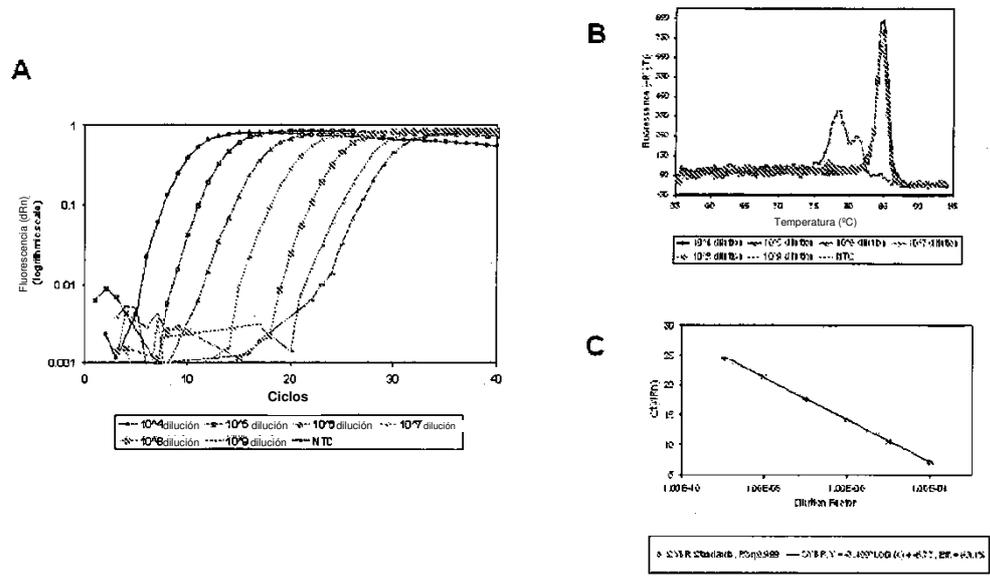


Figura 3

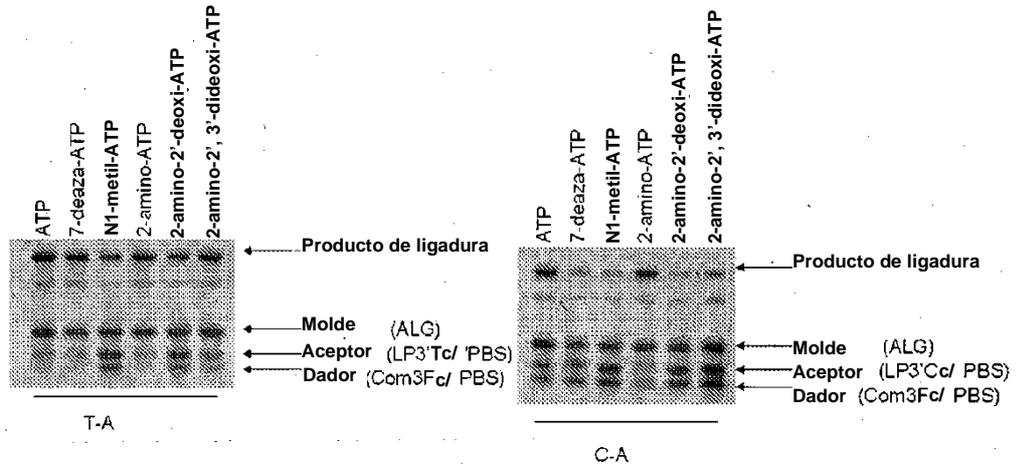


Figura 4

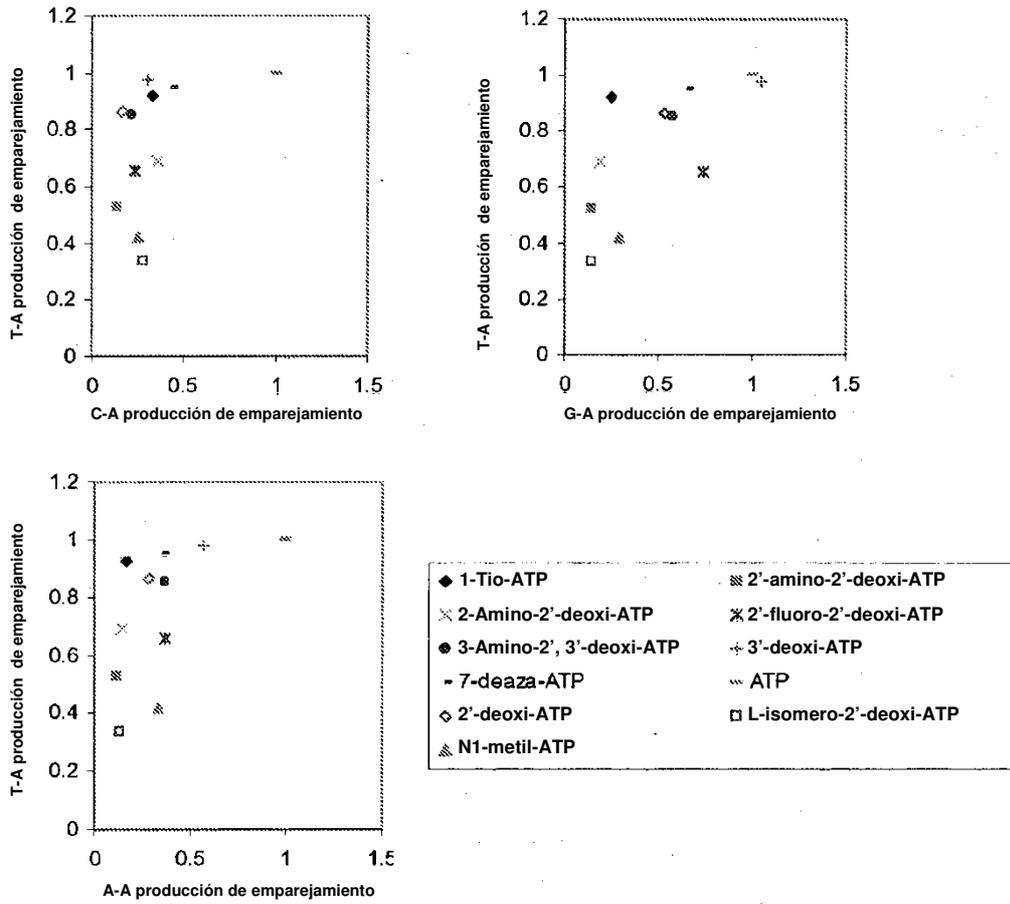


Figura 5

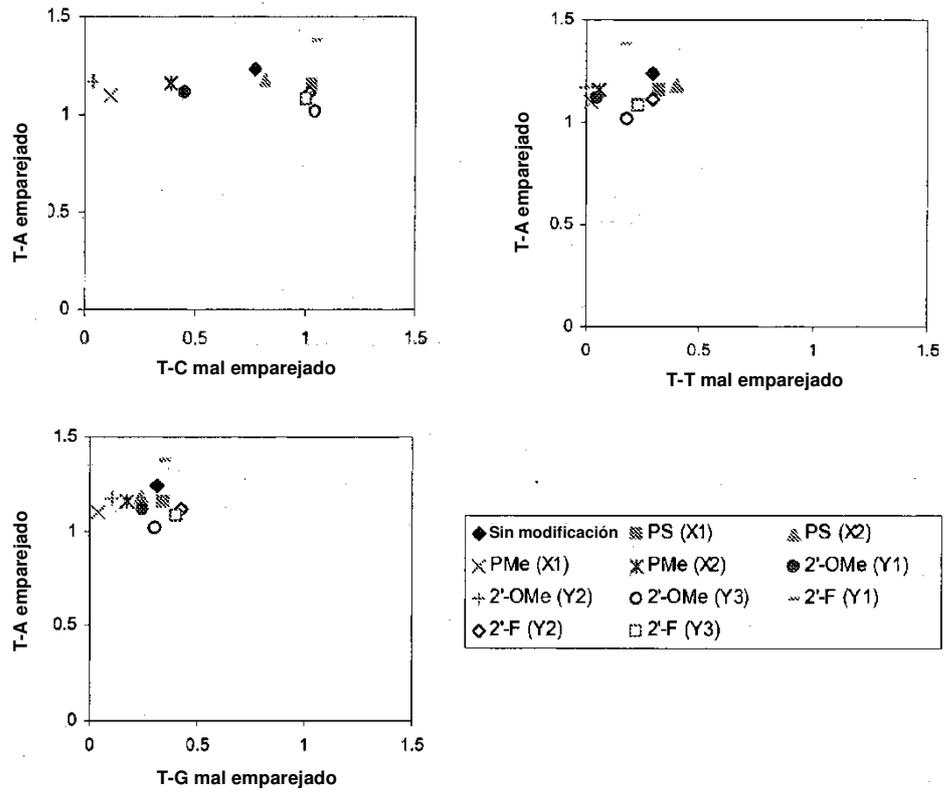


Figura 6

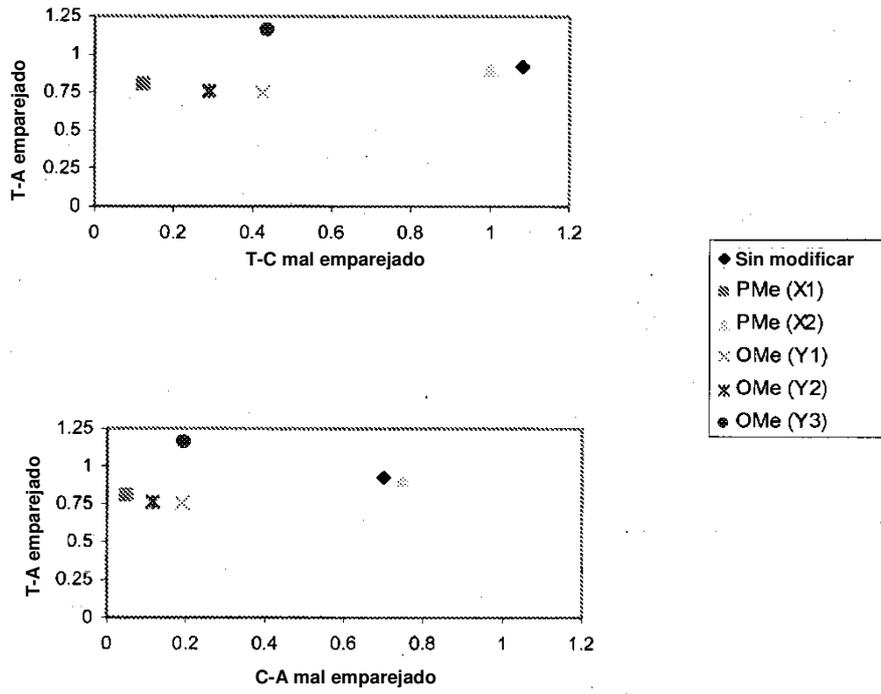


Figura 7

T-A emparejado

		Cofactor ATP modificado						
		ATP	2'-dATP	alfa-tio-ATP	2'-amino-2'-dATP	2-amino-2'-dATP	3'-amino ddATP	2-amino ATP
Sonda de aceptor modificado	Sin modificación	1.18	0.75	0.63	0.61	0.66	0.99	0.50
	PS (X1)	0.92	0.45	0.65	0.64	0.71	0.94	0.61
	PMe (X1)	1.07	0.19	0.49	0.48	0.47	1.22	0.20
	PMe (X2)	0.74	0.07	0.64	0.25	0.32	0.72	0.42
	Ome (Y1)	0.80	0.08	0.88	0.17	0.23	0.90	0.38
	Ome (Y1)	0.94	0.21	0.87	0.38	0.47	1.11	0.16

Leyenda

	> 0.85
	0.70 a 0.85
	0 a 0.70

T-C mal emparejado

		Cofactor ATP modificado						
		ATP	2'-dATP	alfa-tio-ATP	2'-amino-2'-dATP	2-amino-2'-dATP	3'-amino ddATP	2-amino ATP
Sonda de aceptor modificado	Sin modificación	0.11	0.04	0.05	0.10	0.07	0.07	0.10
	PS (X1)	0.19	0.06	0.06	0.11	0.08	0.06	0.13
	PMe (X1)	0.00	0.01	0.00	0.01	0.00	0.00	0.00
	PMe (X2)	0.05	0.02	0.01	0.04	0.03	0.03	0.02
	Ome (Y1)	0.05	0.01	0.01	0.07	0.04	0.04	0.02
	Ome (Y1)	0.00	0.00	0.02	0.00	0.01	0.01	0.00

Leyenda

	0.0 a 0.01
	0.01 a 0.10
	0.10 a 1.00

Figura 8