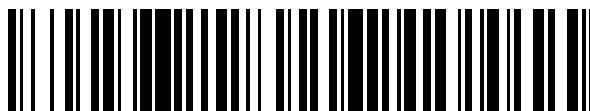


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 773 313**

51 Int. Cl.:

C12Q 1/6816 (2008.01)

C12Q 1/6844 (2008.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **30.10.2014 PCT/GB2014/053238**

87 Fecha y número de publicación internacional: **07.05.2015 WO15063498**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **30.10.2014 E 14793265 (1)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **20.11.2019 EP 3063292**

54 Título: **Sonda de ácido nucleico con un único marcador fluoróforo unido a una citosina interna para uso en amplificación isotérmica mediada por bucle**

30 Prioridad:

30.10.2013 GB 201319180

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

10.07.2020

73 Titular/es:

**MAST GROUP LIMITED (100.0%)
Mast House Derby Road Bootle
Liverpool, Merseyside L20 1EA, GB**

72 Inventor/es:

**SUWARA, MONIKA IWONA;
JAVED, SAJID y
GILLIES, ELIZABETH ANN**

74 Agente/Representante:

SALVÀ FERRER, Joan

ES 2 773 313 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

Sonda de ácido nucleico con un único marcador fluoróforo unido a una citosina interna para uso en amplificación isotérmica mediada por bucle

[0001] La presente invención se refiere a una sonda para la detección de un ácido nucleico, un método en el que se utiliza dicha sonda y un kit de partes. Preferentemente, la sonda de la invención es útil en un método para la detección de ácidos nucleicos obtenidos a partir de *Chlamydia trachomatis* y/o *Neisseria gonorrhoeae*, y se puede utilizar en el diagnóstico de infecciones por clamidia y/o gonorrea.

[0002] La amplificación de ácidos nucleicos es uno de los recursos más valiosos en el campo de las ciencias de la vida, con inclusión de los campos orientados a aplicaciones como la medicina clínica, donde resulta particularmente útil en el diagnóstico de enfermedades infecciosas, trastornos genéticos y rasgos genéticos. Además de la detección mediante PCR ampliamente utilizada (Saiki R.K., Scharf, S., Faloona, F., Mullis, K.B., Horn, G.T., Erlich, H.A. y Arnheim, N. (1985) Science, 230, 1350-1354), se han inventado varios métodos de amplificación. Algunos ejemplos son la amplificación basada en la secuencia de ácidos nucleicos (NASBA), la replicación de secuencias autosostenida (3SR) y la amplificación isotérmica mediada por bucle (LAMP). En la PCR se utiliza la desnaturalización térmica de productos de ADN bicatenario para impulsar la siguiente ronda de síntesis de ADN. La 3SR y la NASBA eliminan la desnaturalización térmica mediante el uso de una serie de reacciones de transcripción y retrotranscripción para amplificar la secuencia de interés.

[0003] Con estos métodos se puede amplificar ácidos nucleicos de interés a una magnitud similar, todo con un límite de detección inferior a 10 copias y en aproximadamente una hora. Se requiere un instrumento de precisión para la amplificación o un método complejo para la detección de los productos de amplificación debido a la escasa especificidad de la selección de la secuencia de interés. A pesar de la simplicidad y la magnitud de la amplificación obtenible, el requerimiento de utilizar un termociclador de alta precisión para la PCR impide que este poderoso método se utilice ampliamente, como, por ejemplo, en clínicas privadas como herramienta de diagnóstico de rutina. Por el contrario, la LAMP es un método con el que se pueden amplificar unas pocas copias de ADN a más de 100 en menos de una hora en condiciones isotérmicas y con una mayor especificidad.

[0004] Como ocurre con otras tecnologías con sondas moleculares que se han indicado más arriba, los ensayos de amplificación isotérmica mediada por bucle (LAMP) se pueden utilizar para detectar la presencia de microorganismos específicos en una muestra. Sin embargo, los métodos de detección se basan en la detección visual directa, la turbidez, o en estos se utiliza un colorante intercalante del ADN no específico. La determinación visual directa constituye una determinación del punto final y no puede proporcionar un análisis en tiempo real. La turbidez y los colorantes intercalantes no específicos proporcionan análisis en tiempo real de la amplificación que tiene lugar. No obstante, estos no son específicos, es decir, se detecta toda la amplificación, tanto si es una amplificación positiva auténtica, como si se trata de una amplificación falsa debido a un cebado incorrecto, especificidad cruzada.

[0005] Según un primer aspecto de la presente invención, se proporciona un método, una sonda y un kit, como se define en las reivindicaciones.

[0006] En una realización preferida, la secuencia de la sonda oligonucleotídica es una secuencia de ADN y la secuencia del ácido nucleico de interés es una secuencia de ADN.

[0007] Preferentemente, la base de citosina está dispuesta sustancialmente de manera central a lo largo de la cadena oligonucleotídica. Existen beneficios particulares asociados al marcaje de la sonda en la parte interna en una base de citosina. La especificidad del producto de ADN amplificado en una reacción isotérmica se puede confirmar mediante un análisis de la curva de fusión. Sin embargo, debido al gran número de variantes del producto generadas en esta reacción y a la baja resolución del análisis de la curva de fusión, mediante el uso de colorantes intercalantes como el V13 es muy difícil distinguir entre los productos de ADN específicos y los no específicos que se generan en condiciones isotérmicas. Las sondas comúnmente utilizadas, como la sonda TaqMan®, no son compatibles con la tecnología LAMP debido a la actividad de desplazamiento de la hebra de la polimerasa Bst. La sonda de la invención se alarga y se incorpora a un producto de ADN durante la amplificación isotérmica, lo que permite realizar un análisis de la curva de fusión en el producto generado. En la sonda de la invención, el fluoróforo está conjugado a una citosina interna complementaria a una guanina en la hebra antisentido. La guanina afecta al estado de excitación de muchos fluoróforos, lo que da lugar a la formación de características singulares en las curvas de fusión, y permite distinguir entre los productos específicos y los no específicos generados en condiciones isotérmicas.

[0008] El oligonucleótido no contiene ddNTP en su extremo 3', lo que permite la incorporación del oligonucleótido marcado al amplicón. De esta manera, el extremo 3' de la sonda no está «bloqueado». El fluoróforo puede comprender uno o más seleccionados de entre los siguientes: FAM, JOE, TET, HEX, TAMRA, ROX, ALXA y ATTO.

[0009] La sonda puede comprender la siguiente secuencia:

5' X_n C* X_m 3' (SEC. N.º ID. 1)

Donde n es >1, m es >3, X es una base nucleotídica; y * es un fluoróforo. Preferentemente, la base nucleotídica se

selecciona de entre A, T, C y G. Preferentemente, n es más de 1 a 20, y más preferentemente, más de 1 a 10. Preferentemente, m es más de 3 a 20, y más preferentemente, más de 3 a 10. Se prevé que se dan a conocer todas las combinaciones de cadenas de sonda abarcadas por el número posible de nucleótidos a los que n o m pueden dar lugar según los intervalos precedentes.

[0010] Preferentemente, la sonda puede comprender una secuencia seleccionada de cualquiera de las siguientes secuencias:

SEC. N.º ID. 3: TAAGATAAC[C-FAM]CCGCACGTG
 SEC. N.º ID. 5: GCGAACATA [C-ALEXA546] CAGCTATGATCAA o
 SEC. N.º ID. 6: ATGTTCA [C-JOE] CATGGCGGAG

[0011] La fluorescencia aumenta cuando el oligonucleótido se incorpora a la secuencia del ácido nucleico de interés, lo que da lugar a un cambio en la configuración del complejo amplicón-sonda, produciéndose una alteración en el estado de excitación del fluoróforo.

[0012] La citosina unida al ligando fluoróforo no está dispuesta en el extremo 5' o 3', ni en la proximidad del extremo 5' o 3'. Más preferentemente, no está dispuesta en las primeras 3 bases empezando desde el extremo 5' o 3'. Preferentemente, la citosina unida al fluoróforo está dispuesta en la base del punto medio de la sonda.

[0013] De acuerdo con un aspecto adicional de la presente invención, se proporciona una sonda para amplificación isotérmica mediada por bucle como la descrita anteriormente.

[0014] En los métodos y composiciones para determinar al menos un ácido nucleico de interés en una mezcla de ácidos nucleicos por lo general se emplea una sonda, un reactivo de hibridación, y una o más enzimas formadoras de enlaces fosfato asociadas a cualquier trifosfato de nucleótido necesario para formar una cadena de ácido nucleico.

[0015] Estos métodos suelen suponer la amplificación, como la inclusión del uso de un promotor junto con una ARN polimerasa, un sitio de restricción donde solo se escinde una hebra y, a continuación, se desplaza mediante extensión con una ADN polimerasa, o un reactivo de hibridación circular, donde se producen repeticiones concatenadas. La detección del ácido nucleico amplificado puede tener lugar de muchas maneras, pero preferentemente se realiza por medio de un fluoróforo.

[0016] De acuerdo con un aspecto adicional de la presente invención, se proporciona un método de LAMP para detectar un ácido nucleico de interés en una muestra, tal y como se define en la reivindicación 1.

[0017] El ácido nucleico de interés puede ser el de un microorganismo, un hongo, una levadura, un virus, una persona, un animal, una planta, etc. Se sabe que el ácido nucleico de interés para la LAMP permite la síntesis de sondas específicas apropiadas y cebadores para LAMP. De esta manera, se puede determinar la presencia o la ausencia de dicho microorganismo, hongo, levadura, virus, persona, animal o planta en una muestra. Preferentemente, el ácido nucleico de interés se obtiene a partir de *Chlamydia trachomatis* o *Neisseria gonorrhoeae*.

[0018] La fluorescencia aumenta para indicar la presencia del ácido nucleico de interés en una muestra.

[0019] El proceso es isotérmico, y permite la amplificación en una sola etapa o en etapas secuenciales en un solo recipiente, donde todos los reactivos son compatibles.

[0020] En un aspecto adicional, la presente invención proporciona un método para diagnosticar clamidia y/o gonorrea en un paciente, tal y como se define en la reivindicación 10.

[0021] La muestra se puede tratar mediante métodos de rutina para permitir que la sonda se una a cualquier nucleótido de interés presente en la muestra. Dicho tratamiento puede incluir el centrifugado y el lisado de la muestra para liberar cualquier ácido nucleico de interés a partir del microorganismo infeccioso.

[0022] En una realización, en el método se utiliza un único tipo de sonda específica para un ácido nucleico de *Chlamydia trachomatis* o de *Neisseria gonorrhoeae*, de tal manera que en la muestra se detecta solo *Chlamydia trachomatis* o solo *Neisseria gonorrhoeae*.

[0023] En una realización preferida, a la muestra se añaden al menos dos sondas distintas, donde una primera sonda se marca con un primer marcador fluorescente y es específica para sondear el ácido nucleico de *Chlamydia trachomatis*, y una segunda sonda se marca con un marcador fluorescente distinto al de la primera sonda y es específica para sondear el ácido nucleico de *Neisseria gonorrhoeae*. En esta realización, es posible detectar simultáneamente una infección por clamidia y una infección por gonorrea en una sola muestra obtenida de un paciente.

[0024] En un aspecto del método de la invención, la muestra del paciente puede ser una muestra de sangre, una muestra de orina, una muestra de suero o una muestra de saliva.

[0025] Según un aspecto adicional de la presente invención, se proporciona un kit que comprende una sonda como la que se describe más arriba, una solución amortiguadora para la reacción de LAMP que contiene una enzima polimerasa, dNTP y cebadores para LAMP para la secuencia de interés.

[0026] En una realización, el kit puede incluir un control positivo y un control negativo. Los reactivos pueden presentarse como reactivos húmedos o en forma liofilizada.

[0027] La solución amortiguadora utilizada en el método o kit de la invención comprende dNTP a una concentración de 1-10 mM, una o más sales a una concentración de 2-20 mM, Tris pH 8,8 a una concentración de 10-100 mM, trehalosa a una concentración de 10-100 mM, polimerasa Bst en una cantidad de 1U-12 U y 1,2 propanodiol al 0,01%-1%.

Abreviaturas

[0028]

CT: *Chlamydia trachomatis*
 GC: *Neisseria gonorrhoeae*
 GlnA7: glutamina sintetasa
 PorA7: proteína porina A7
 LAMP: amplificación isotérmica mediada por bucle
 PCR: reacción en cadena de la polimerasa.

[0029] A continuación, la presente invención se describirá, únicamente a título de ejemplo, con referencia a los siguientes ejemplos y figuras.

Reacción de LAMP

[0030] La detección con V13 del ADN de interés de CT y GT mediante LAMP se realizó con la solución amortiguadora de reacción V6.21 para LAMP desarrollada por el solicitante. La detección con sonda del ADN de interés se realizó en V6.21p (sin V13). Las concentraciones de cebadores para la LAMP fueron las siguientes: PB1 de CT: cebadores FIP y BIP, 0,8 µM; cebadores F3 y B3, 0,2 µM; y cebadores en bucle, 0,4 µM; porA7 de GC y glnA7 de GC: cebadores FIP y BIP, 2 µM; cebadores F3 y B3, 0,25 µM; y cebadores en bucle, 0,5 µM. Todas las sondas se utilizaron a una concentración final de 0,625 µM. Las reacciones de LAMP duraron 60 min a una temperatura constante de 63 °C y se llevaron a cabo en una máquina ABI7500 de PCR en tiempo real. Las lecturas de la señal fluorescente se obtuvieron en el canal SybrGreen/FAM, Joe o Cy3, según procediera.

Secuencias de sonda

[0031]

SEC. N.º ID. 2: GTGCACGC[C-FAM]CCAATAGAAT
 SEC. N.º ID. 3: TAAGATAAC[C-FAM]CCGCACGTG
 SEC. N.º ID. 4: TCGAGCAA[C-FAM]CGCTGTGAC[ddC]
 SEC. N.º ID. 5: GCGAACATA [C-ALEXA546] CAGCTATGATCAA
 SEC. N.º ID. 6: ATGTTCA [C-JOE] CATGGCGGAG o
 SEC. N.º ID. 7: CCA GGG TAT CTA ATC CTG TTT G[C-FAM].

Secuencias de interés

[0032] Las secuencias de ADN de interés utilizadas en los ejemplos son

SEC. N.º ID. 8: Secuencia completa del plásmido pSotonG1 de *Chlamydia trachomatis* G/SotonG1 (GenBank: HE603235.1)

ES 2 773 313 T3

1 tttgcaactc ttgggtgtag actttgcaac tcttggtggt agactttgca actccttggtg
 61 gtagacttgg tcataatgga cttttgttaa aaaatttctt aaaatcttag agctccgatt
 121 ttgaatagct ttggtaaga aaatgggctc gatggcttcc cataaaagta gattgttctt
 181 aacttttggg gacgcgtcgg aaatttggtt atctacttta tctcatctaa ctagaaaaaa
 241 ttatgogtct gggattaact ttcttgtttc tttagagatt ctggatttat cggaaacctt
 301 gataaaggct atttctcttg accacagcga atctttggtt aaaatcaagt ctctagatgt
 361 ttttaatgga aaagtcgttt cagaggcctc taaacaggct agagcggcat gctacatata
 421 tttcacaaaag tttttgtata gattgacca gggatatatt aaaccgccta ttcattgaa
 481 agattttgga aacactacat tttttaaact cggagacaaa atcaaaacag aatcgatttc
 541 taagcaggaa tggacagttt tttttgaagc gctccggata gtgaattata gagactattt
 601 aatcggtaaa ttgattgtac aagggatccg taagttagac gaaattttgt ctttgccac
 661 agacgatcta ttttttgcac ccaatcagat ttcctttcgc attaaaaaaa gacagaataa
 721 agaaacaaa attctaata catttcctat cagcttaatg gaagagttgc aaaaatacac
 781 ttgtgggaga aatgggagag tatttgtttc taaaataggg attcctgtaa caacaagtca
 841 ggttgccgat aattttaggc ttgcagagtt ccatagtgtc atgaaaataa aaattactcc
 901 cagagtactt cgtgcaagcg ctttgattca tttaaagcaa ataggattaa aagatgagga
 961 aatcatgogt atttcctgtc tctcatcgag acaaagtgtg tgttcttatt gttctgggga
 1021 agaggtaagt cctctagtac aaacacccac aatattgtga tataattaa attatattca
 1081 tattctgttg ccagaaaaaa cacctttagg ctatattaga gccatcttct ttgaagcgtt
 1141 gtcttctcga gaggatttat cgtacgcaa tatcatcttt gcggttgcgt gtcccgtgac
 1201 cttcattatg tcggagtctg agcaccttag gcgtttgtag tccgtcacag cggttgctcg
 1261 aagcacgtgc ggggttatct taaaagggat tgcagcttgt agtcctgctt gagagaacct
 1321 gcgggogatt tgccttaacc ccaccatttt tccggagcga gttacgaaga caaacctct
 1381 tcggtgaccg atgtactctt gtagaaagtg cataaacttc tgaggataag ttataataat
 1441 cctcttttct gtctgacggt tcttaagctg ggagaaagaa atggtagctt gttggaaaca
 1501 aatctgacta atctccaagc ttaagacttc agaggagcgt ttacctcctt ggagcattgt
 1561 ctgggogatc aaccaatccc gggcgttgat ttttttagc tcttttagga aggatgctgt
 1621 ttgcaaactg ttcategcat ccgtttttac tatttcctg gttttaaaaa atgttcgact
 1681 attttcttgt ttagaagggt gcgctatagc gactattcct tgagtcatcc tgtttaggaa
 1741 tcttgtttaag gaaatatagc ttgctgctog aacttgttta gtacctcgg tccaagaagt
 1801 cttggcagag gaaacttttt taatcgcatc taggattaga ttatgattta aaagggaata
 1861 ctcttgcaaga ttcataatcca aagacaatag accaatcttt tctaaagaca aaaaagatcc
 1921 tcgatatgat ctacaagtat gtttggtgag tgatgcggtc caatgcataa taacttcgaa
 1981 taaggagaag cttttcatgc gtttccaata ggattcttgg cgaattttta aaacttcctg
 2041 ataagacttt tcgctatatt ctaacgacat ttcttgctgc aaagataaaa tccctttacc
 2101 catgaaatcc ctctgatat aacctatccg caaaatgtcc tgattagtga aataatcagg
 2161 ttgtaaacag gatagcacgc tcggtatttt tttatataaa catgaaaact cgttccgaaa
 2221 tagaaaatcg catgcaagat atcgagtatg cgttggttagg taaagctctg atatttgaag
 2281 actctactga gtatattctg aggcagcttg ctaattatga gtttaagtgt tccatcata
 2341 aaaacatatt catagtattt aaatacttaa aagacaatgg attacctata actgtagact
 2401 cggcttggga agagcttttg cggcgtcgta tcaaagatat ggacaaatcg tatctcgggt

ES 2 773 313 T3

2461 taatgttgca tgatgcttta tcaaatgaca agcttagatc cgtttctcat acggttttcc
 2521 tcgatgattt gagcgtgtgt agcgtgaag aaaatttgag caatttcatt ttcgctcgt
 2581 ttaatgagta caatgaaaat ccattgcgta gatctccggt tctattgctt gagcgtataa
 2641 agggaaggct tgatagtgtc atagcaaaga cttttctat tcgcagcgt agaggccggt
 2701 ctatttatga tatattctca cagtcagaaa ttggagtgtc ggctcgtata aaaaaagac
 2761 gagcagcgtt ctctgagaat caaaattctt tctttgatgg cttcccaaca ggatacaagg
 2821 atattgatga taaaggagtt atcttagcta aaggtaattt cgtgattata gcagctaggc
 2881 catctatagg gaaaacagct ttagctatag acatggcgat aaatcttgcg gttactcaac
 2941 agcgtagagt tggtttccta tctctagaaa tgagcgcagg tcaaattggt gagcggattg
 3001 ttgctaattt aacaggaata tctggtgaaa aattacaaag aggggatctc tctaaagaag
 3061 aattattccg agtgaagaa gctggagaaa cagttagaga atcacatttt tatactgca
 3121 gtgatagtca gtataagctt aatttaacg cgaatcagat ccggttgctg agaaaagaag
 3181 atcgagttaga cgtaaatatt atcgattact tgcagttgat caactcatcg gttggagaaa
 3241 atcgtcaaaa tgaaatagca gatatatcta gaaccttaag aggttttagcc tcagagctaa
 3301 acattcctat agtttgttta tcccaactat ctagaaaagt tgaggataga gcaataaag
 3361 tccccatgct ttcagatttg cgagacagcg gtcaaataga gcaagacgca gatgtgattt
 3421 tgtttatcaa taggaaggaa tcgtcttcta attgtgagat aactgttggg aaaaatagac
 3481 atggatcggg tttctcttcg gtattacatt tcgatccaaa aattagtaa ttctccgcta
 3541 ttaaaaaagt atggtaaatt atagtaactg ccacttcac taaaagtccta tccacctga
 3601 aaatcagaag tttggaagaa gacctggtca atctattaag atatctocca aattggctca
 3661 aaatgggatg gtagaagtta taggtcttga ttttcttca tctcattacc atgcattagc
 3721 agctatccaa agattactga ccgcaacgaa ttacaagggg aacacaaaag gggttgtttt
 3781 atccagagaa tcaaatagtt ttcaatttga aggatggata ccaagaatcc gttttacaaa
 3841 aactgaattc ttagaggctt atggagttaa gcggtataaa acatccagaa ataagtatga
 3901 gtttagtgga aaagaagctg aaactgcttt agaagccttg taccatttag gacatcaacc
 3961 gtttttaata gtggcaacta gaactcgatg gactaatgga acacaaatag tagaccgta
 4021 ccaaaactct tctccgatca ttaggattta cgaaggatgg gaaggtttaa ctgacgaaga
 4081 aaatatagat atagacttaa caccttttaa ttcaccatct acacggaaac ataaaggatt
 4141 cgttgtagag ccatgtccta tcttggtaga tcaaatagaa tctactttg taatcaagcc
 4201 tgcaaatgta taccaagaaa taaaaatgcg tttcccaaac gcatcaaagt atgcttacac
 4261 atttatcgac tgggtgatta cagcagctgc gaaaaagaga cgaaaattaa ctaaggataa
 4321 ttcttgccca gaaaacttgt tattaaactg taactgtaaa agtcttgcat atattttaag
 4381 gatgaatcgg tacatctgta caaggaactg gaaaaaaatc gagttagcta tcgataaatg
 4441 tatagaatc gccattcagc ttggctggtt atctagaaga aaacgcattg aatttctgga
 4501 ttcttctaaa ctctctaaaa aagaaattct atatctaaat aaagagcgt ttgaagaaat
 4561 aactaagaaa tctaaagaac aatggaaca agaactatt aattaatagc aggcttgaaa
 4621 ctaaaaacct aatttattta aagctcaaaa taaaaagag ttttaaatg ggaaattctg
 4681 gtttttattt gtataacact gaaaactgcg tctttgctga taatatcaaa gttgggcaaa
 4741 tgacagagcc gctcaaggac cagcaataa tccttgggac aaaatcaaca cctgtcgcag
 4801 ccaaatgac agcttctgat ggaatatctt taacagtctc caataattca tcaaccaatg
 4861 cttctattac aattggttg gatgcggaag aagcttacca gcttattcta gaaaagttgg
 4921 gaaatcaaat tcttgatgga attgctgata ctattgttga tagtacagtc caagatattt
 4981 tagacaaaat cacaacagac ccttctctag gtttggtgaa agcttttaac aactttccaa

ES 2 773 313 T3

5041 tcactaataa aattcaatgc aacgggttat tcactcccag taacattgaa actttattag
 5101 gaggaactga aataggaaaa ttcacagtca cacccaaaag ctctgggagc atgttcttag
 5161 tctcagcaga tattattgca tcaagaatgg aaggcggcgt tgttctagct ttggtagcag
 5221 aaggtgattc taagccctgc gcgattagtt atggatactc atcaggcgtt cctaatttat
 5281 gtagtctaag aaccagcatt actaatacag gattgactcc aacaacgtat tcattacgtg
 5341 taggcggttt agaaaagcgg gtggtatggg ttaatgccct ttctaattggc aatgatattt
 5401 taggaataac aaatacttct aatgtatctt ttttggaggt aatacctcaa acaaacgctt
 5461 aaacaatttt tattggattt ttcttatagg ttttatattt agagaaaaca gttcgaatta
 5521 cggggtttgt tatgcaaaat aaaagaaaag tgagggacga ttttattaaa attgttaaaag
 5581 atgtgaaaaa agatttcccc gaattagacc taaaaatacg agtaaacaag gaaaaagtaa
 5641 ctttcttaaa ttctccctta gaactctacc ataaaagtgt ctactaatt ctaggactgc
 5701 ttcaacaaat agaaaaactct ttaggattat tcccagactc tcctgttctt gaaaaattag
 5761 aggataacag ttaaaagcta aaaaaggctt tgattatgct tatcttgtct agaaaagaca
 5821 tgttttccaa ggctgaatag acaacttact ctaacgttgg agttgatttg cacaccttag
 5881 ttttttgctc ttttaagga ggaactggaa aaacaacact ttctctaaac gtgggatgca
 5941 acttgcccca atttttaggg aaaaagtgt tacttgtctga cctagaccog caatccaatt
 6001 tatcttctgg attggggcct agtgtcagaa ataaccaaaa aggcttgcac gacatagtat
 6061 acaaatcaaa cgatttaaaa tcaatcattt gcgaaacaaa aaaagatagt gtggacctaa
 6121 ttcttgcac atttttatcc gaacagtta gagaattgga tattcataga ggacctagta
 6181 acaacttaaa gttatttctg aatgagtact gcgctccttt ttatgacatc tgcataatag
 6241 acactccacc tagcctagga gggtaaacga aagaagcttt tgttgacagga gacaaattaa
 6301 ttgcttgttt aactccagaa ctttttcta ttctagggtt acaaaagata cgtgaattct
 6361 taagttcggg cggaaaaact gaagaagaac acattcttgg aatagctttg tctttttggg
 6421 atgatcgtaa ctgcactaac caaatgtata tagacattat cgagtctatt tacaanaaca
 6481 agcttttttc aacaaaaatt cgtcagata tttctctcag ccgttctctt cttaaagaag
 6541 attctgtagc taatgtctat ccaaatctta gggccgcaga agatattctg aagttaacgc
 6601 atgaaatagc aaatattttg catatcgaat atgaacgaga ttactctcag aggacaacgt
 6661 gaacaaacta aaaaaagaag cggatgtctt ttttaaaaaa aatcaaaactg ccgcttctct
 6721 agattttaag aagacacttc cttccattga actattctca gcaactttga attctgagga
 6781 aagtcagagt ttggatcgat tatttttatc agagtcccaa aactattcgg atgaagaatt
 6841 ttatcaagaa gacatcctag cggtaaaaact gcttactggg cagataaaat ccatacagaa
 6901 gcaacacgta cttcttttag gagaaaaaat ctataatgct agaaaaatcc tgagtaagga
 6961 tcacttctcc tcaacaactt tttcatcttg gatagagtta gtttttagaa ctaagtcttc
 7021 tgcttacaat gctcttgcat attacgagct ttttataaac ctccccacc aaactctaca
 7081 aaaagagttt caatcgatcc cctataaatc cgcataatatt ttggccgcta gaaaaggcga
 7141 tttaaaaacc aaggtcgatg tgatagggaa agtatgtgga atgtcgaact catcggcgat
 7201 aaggggtgtg gatcaatttc ttcttctatc tagaaacaaa gacgttagag aaacgataga
 7261 taagtctgat ttagagaaga atcgccaatt atctgatttc ttaatagaga tacttccgat
 7321 catatgttcc ggagtttctt tgtctccta taacgaaaat cttctacaac agctttttga
 7381 actttttaag caaaaagact gatcctcogt cagctcatat atatatttat tatatatata
 7441 tttatttagg gatttgattt tacgagagag a

SEC. N.º ID. 9: gen *porA* parcial de *Neisseria gonorrhoeae* para la proteína de membrana externa de clase 1, cepa GC3 (GenBank: HE681886.1)

ES 2 773 313 T3

```

1 gccggcggcg gcgcgaccog ttggggcaat agggaatcct ttgtcggctt ggcaggcgaa
61 ttcggcacgc tgcgcgcggg ccgcgttgcg aatcagtttg acgatgccag ccaagccatt
121 gatccttggg acagcaacaa tgatgtggct tcgcaattgg gtattttcaa acgccacgac
181 gatatgccgg tttccgtacg ctacgactcc ccggactttt ccggtttcag cggcagcgtc
241 caattcgttc cggctcaaaa cagcaagtcc gcctatacgc cggctcattg gactactgtg
301 tataacacta acggtactac tactactttc gttccggctg ttgtcggcaa gcccggatcg
361 gatgtgtatt atgccggctc gaattacaaa aatggcgggt ttgccgggaa ctatgccttt
421 aaatatgcga gacacgcaa tgcggacgt aatgcttttg agttgttctt gctcggcagt
481 gggagtgatg aagccaaagg taccgatccc ttgaaaaacc atcaggtaca ccgctgacg
541 ggcggctatg ggaagggcgg cttgaatctc gccttgccgg ctcagttgga tttgtctgaa
601 aatgocgaca aaaccaaaaa cagtacgacc gaaattgccg ccaactgctc ctaccgcttc
661 ggtaatacag tcccgcgcac cagctatgcc catggtttcg actttgtcga acgcagtcag
721 aaacgcgaac ataccagcta tga

```

SEC. N.º ID. 10: secuencias codificantes parciales del alelo *glnA-14* del gen de la glutamina sintetasa (*glnA*) de *Neisseria gonorrhoeae*, (GenBank: AF520262.1)

```

1 ccgcctttgt cgatttgccg ttcaccgata ccaaaggcaa gcagcaccac tttaccgtgc
61 ctgcgcgcac cgtgttgaa gaccccgaag agtggtttga aaacggaccg gcgtttgacg
121 gctcgtccat cggcggctgg aaaggcattg aggcttccga tatgcagctg cgtcccgatg
181 cgtccacagc cttcgtcgat cctttttatg atgatgttac cgtcgtcatt acctcgcagc
241 tcatcgaccg tgcgcacggt cagggttacg accgcgaccc gcgctccatc gcacgcgcgg
301 ccgaagccta tttgaaatct tccggtatcg gcgacaccgc ctatttcggc cccgaaccgg
361 aattcttctg cttcgacggc gtagaatttg aaaccgacat gcacaaaacc cgttacgaaa
421 tcacgtccga aagcggcggg tgggcaagcg gcctgcataat ggacgggcaa aacaccggcc
481 accgccccgc cgtcaaaggc ggctacgcgc ccgctcgcgc gattgactgc ggtcaagatt
541 tgcgctccgc catggtgaac attttgaag gactcggcat cgaagtogaa gtccaccaca
601 gcgaagtggg taccggcagc caaatggaaa tcggcaccgg tttcggcact ttggtcaaac
661 gcgcccagca aacccaagat atgaaatag tcatcaaaaa cgttgccac aatttcggca
721 aaaccgccac ctttatgccc aaaccgatta tgggcgacaa cggcagcggg atgcacgtcc
781 accaatccat ttgaaaagac ggtcaaaaacc tgttcgcagg cgacggctat gccggtttgt
841 ccgataaccg gctctactac atcggcggca tcatcaaaaa cgccaaagcc ctgaacgcga
901 ttaccaatcc gtccaccaac tcctacaaac gcctcgtgcc gcactttgaa gcaccgacca
961 aattggccta ttcggccaaa aaccgttcog cttccatccg tatcccgtct gtgaacagca
1021 gcaagggcgg ccgcatcgaa gcgcgtttcc ccgaccggac cgccaaccgg tatttgccat
1081 ttgccgcctt gctgatggcc ggtttggacg gcattcaaaa caaaatccat ccgggcgacc
1141 ctgccgataa aaacctgtac gacctgcgc cggaagaaga cgcgctcgtc ccgaccgtct
1201 gcgcttcttt ggaagaagca cttgccgccc tcaaggtcga ccacgaatcc ctgctgcgcg
1261 gcggcggtgt cagcaaagac tggatcgaca gctacatcgc ctttaagag gaagatgtcc
1321 gcgcatccg tatggcgccg cacccgctgg aatttg

```

5

[0033] Las secuencias de cebador utilizadas en la reacción de LAMP son las siguientes:

Plásmido de CT

10

[0034]

15

F3 TCTACAAGAGTACATCGGTCA (SEC. N.º ID. 11)
 B3 TGAAGCGTTGTCTTCTCG (SEC. N.º ID. 12)
 FIP GCAGCTTGTAGCTGCTTGAGTCTTCGTAACCTCGCTCC (SEC. N.º ID. 13)
 BIP TCGAGCAACCGCTGTGACCCTTCATTATGTCCGAGTCTG (SEC. N.º ID. 14)

LF1 CGGGCGATTTGCCTTAAC (SEC. N.º ID. 15)
 LB1 TACAAACGCCTAGGGTGC (SEC. N.º ID. 16)

porA7 de GC

5

[0035]

F3 ACCAAAAACAGTACGACCGA (SEC. N.º ID. 17)
 B3 AAGTGCCTTGAAAAATCG (SEC. N.º ID. 18)
 10 FIPATGGGCATAGCTGATGCGCGAATTGCCGCGACTGCTTC (SEC. N.º ID. 19)
 BIP TCGACTTTGTGCGAACGCGAGTCAAATCGACACCGGCGATGA (SEC. N.º ID. 20)
 LoopF1 GCGAACATACCAGCTATGATCAA (SEC. N.º ID. 21)

glnA7 de GC

15

[0036]

F3 TCATATCTTGGGTTTGGTCG (SEC. N.º ID. 22)
 B3 CTGCATATGGACGGTCAA (SEC. N.º ID. 23)
 20 FIP CGAAGTCCACCACAGCGAATTTGACCAAAGTGGCGAA (SEC. N.º ID. 24)
 BIP CTTGATGCCGAGTCCTTCCGATTGACTGCGGTCAAGAT (SEC. N.º ID. 25)
 LF CAAATGGAAATCGGCACCC (SEC. N.º ID. 26)
 LB ATGTTACCATGGCGGAG (SEC. N.º ID. 27)

25 Solución amortiguadora

[0037] El solicitante ha desarrollado un sistema de solución amortiguadora para su uso con las sondas de la invención, al que en los siguientes ejemplos se designa como V6.21 (o V6.21p sin colorante V13). Las concentraciones de los componentes de la solución amortiguadora tras la reconstitución de esta son:

30

V6.21

[0038] dNTP a 4-10 mM, sal a 10 mM, Tris pH 8,8 a 30 mM, trehalosa a 30 mM, 1-8 U de polimerasa Bst, colorante y propanodiol al 0,05%.

35

V6.21p

[0039] dNTP a 4-10 mM, sal a 10 mM, Tris pH 8,8 a 30 mM, trehalosa a 30 mM, 1-8 U de polimerasa Bst y propanodiol al 0,05%.

40

[0040] La detección de CT/GC en muestras clínicas mediante PCR en tiempo real se llevó a cabo mediante el ensayo múltiple APTIMA CT/GC (Gen-Probe) conforme a las instrucciones del fabricante.

Electroforesis en gel de agarosa

45

[0041] La electroforesis del ADN se realizó en gel de agarosa al 1% y solución amortiguadora TAE 1X a 100 V. Los productos de ADN obtenidos mediante LAMP se visualizaron con GelRed (Invitrogen) en un transiluminador.

[0042] La solución amortiguadora V6.21 y V6.21p fue desarrollada por el solicitante. Los cebadores para LAMP se obtuvieron de Eurofins. Los oligonucleótidos marcados con fluoróforo se adquirieron de Integrated DNA Technologies. La solución amortiguadora Tris, el gel de agarosa y el agua de calidad para PCR se adquirieron de Sigma. Los patrones de ADN de CT y GC se obtuvieron de la ATCC.

50

Figuras

55

[0043] La Figura 1 es un esquema de la sonda de ADN de la invención. La sonda consiste en un oligonucleótido con una citosina interna conjugada con un fluoróforo definido. La sonda puede ser complementaria a la región interna del amplicón flanqueado por los cebadores Fip y Bip, o puede ser un cebador LoopF o LoopB modificado marcado en la parte interna con un fluoróforo.

60

Ejemplo 1

[0044] En las Figuras 2A a 2F se muestran las gráficas de amplificación generadas con los cebadores PB1 de CT (Figura 2A y Figura 2D), glnA7 de GC (Figura 2B y Figura 2E) y porA7 de GC (Figura 2C y Figura 2F) en la solución amortiguadora V6.21 que contenía V13 (Figuras 2A, 2B y 2C) o la solución amortiguadora V6.21p sin colorante V13 (Figuras 2D, 2E y 2F). Las secuencias de interés que se muestran en las SEC. N.º ID. 8 a 10 con la sonda interna PB1

65

de CT conjugada con FAM, la sonda en bucle glnA7 de GC conjugada con Joe y la sonda en bucle porA7 de GC conjugada con Alexa546, respectivamente. Todas las reacciones se realizaron durante 60 minutos a una temperatura constante de 63 °C con una máquina ABI7500.

5 Ejemplo 2

10 [0045] Las Figuras 3A y 3B son análisis de la curva de fusión de los productos de LAMP generados con los cebadores PB1 de CT en presencia de la sonda interna PB1 de CT conjugada con FAM. Como control positivo se utilizaron 100 pg por reacción del patrón de ADN de CT de la ATTC. A: gráfica del indicador normalizada; B: gráfica del indicador derivada. Las gráficas de las curvas de fusión se generaron basándose en las lecturas realizadas en el canal de FAM con la máquina ABI7500.

Ejemplo 3

15 [0046] Las Figuras 4A y B son análisis de la curva de fusión del producto de LAMP generado con los cebadores glnA7 de GC en presencia de una sonda en bucle glnA7 de GC conjugada con JOE. Como control positivo se utilizaron 100 pg por reacción del patrón de ADN de GC de la ATTC. En la Figura 4A se muestra una gráfica del indicador normalizada y en la Figura 4B se muestra una gráfica del indicador derivada. Las gráficas de las curvas de fusión se generaron basándose en las lecturas realizadas en el canal de JOE con la máquina ABI7500.

20 Ejemplo 4

25 [0047] Las Figuras 5A y B son análisis de la curva de fusión del producto de LAMP generado con los cebadores porA7 de GC en presencia de una sonda en bucle porA7 de GC conjugada con ALEXA546. Como control positivo se utilizaron 100 pg por reacción del patrón de ADN de GC de la ATTC. En la Figura 5A se muestra una gráfica del indicador normalizada, y en la Figura 4B se muestra una gráfica del indicador derivada. Las gráficas de la curva de fusión se generaron basándose en las lecturas realizadas en el canal de Cy3 con la máquina ABI7500.

30 Ejemplo 5

35 [0048] En las Figuras 6A a 6D se muestran los resultados de una prueba para confirmar la especificidad del producto de ADN con una sonda de la invención en la amplificación isotérmica mediada por bucle. El tiempo de amplificación tardío de los falsos positivos, más de 30 minutos tras alcanzar la concentración más baja detectable de ADN de interés en la reacción de LAMP (100 fg de ADN de GC), indica que la amplificación no específica podría deberse a la formación de dímeros de cebadores. El análisis de la curva de fusión estándar no permite distinguir entre el producto específico y el no específico en esta reacción de LAMP, pero el producto no específico se puede identificar con la sonda de la invención. El ADN de GC se amplificó con los cebadores porA7 de GC y se visualizó con el colorante V13 o la sonda porA7-ALXA546 de GC, según procediera.

40 Ejemplo 6

45 [0049] En la Figura 7 se muestran las gráficas de amplificación generadas con los cebadores PB1 de CT en la solución amortiguadora V6.21 que contenía V13 o la solución amortiguadora V6.21p sin colorante V13, pero en presencia de una sonda terminal PB1 de CT (complementaria a la región en bucle) con una C interna conjugada con FAM y un terminador en el extremo 3' (3'ddC). A pesar de que se logró una amplificación satisfactoria del ADN de interés, lo que se confirmó por la excitación del colorante V13 en la reacción de control, la sonda PB1 de CT con el terminador en el extremo 3' no generó una señal positiva.

50 Ejemplo 7

55 [0050] En las Figuras 8A y 8B se muestran las gráficas de amplificación generadas en la solución amortiguadora V6.21p que contenía ROX en presencia de los cebadores PB1 de CT y la sonda terminal PB1 de CT con una citosina interna conjugada con FAM (Figura 8A), y los cebadores universales y la sonda 3'UP con citosina en el extremo 3' conjugada con FAM (Figura 8B). La primera línea representa las señales generadas por ROX, y la segunda línea corresponde a la señal generada en el canal de FAM. La unión al ADN de interés de la sonda con una C marcada en la parte interna produce la excitación de FAM. La unión al ADN de interés de la sonda con una C marcada en el extremo 3' no altera el estado de excitación de FAM.

60 Ejemplo 8

65 [0051] En las Figuras 9A a 9C se muestran las gráficas de amplificación generadas con los cebadores PB1 de CT en la solución amortiguadora V6.21p sin V13 en presencia de la sonda interna PB1 de CT con una C interna conjugada con FAM y un colorante de referencia (ROX). En la Figura 9A se muestran los datos sin procesar, las lecturas del canal de FAM en la primera línea y las del canal de ROX en una segunda línea. En la Figura 9B se muestran las gráficas de amplificación (generadas en el canal de FAM) normalizadas a ROX. En la Figura 9C se muestran las gráficas derivadas de las curvas de fusión del indicador.

Ejemplo 9

5 [0052] En las Figuras 10A a 10C se muestra la validación de la especificidad de la sonda PB1-FAM de CT. En la Figura 10A se muestran las gráficas de amplificación generadas con la sonda PB1-FAM de CT en presencia de ADN de CT y cebadores de CT. Como control, se llevaron a cabo dos series de reacciones donde genes no específicos, *glnA7* de GC y *porA7* de GC se amplificaron con los cebadores para LAMP correspondientes en presencia de la sonda PB1-FAM de CT. En la solución amortiguadora V6.21p, las gráficas de amplificación en presencia de la sonda PB1 de CT en el canal de FAM se generaron solamente cuando el ADN de CT estaba presente en la reacción, y no se generó ninguna señal cuando se amplificaron los genes no específicos (*glnA7* de GC y *porA7* de GC). Tampoco se generó ninguna señal al utilizar una sonda no específica en una reacción en la que el ADN de CT se amplificó con cebadores de CT. En la Figura 10C se muestran los datos obtenidos en un experimento análogo, pero realizado en la solución amortiguadora V6.21 que contenía un colorante intercalante V31. En la Figura 10C se muestran los productos de ADN generados en el experimento descrito en la Figura 10A.

Ejemplo 10

20 [0053] En las Figuras 11A y 11B se muestra la validación de la sonda PB1-FAM de CT frente al ensayo APTIMA CT. Cincuenta muestras clínicas de las que se confirmó que eran positivas (n = 29) (Figura 11A) o negativas (n = 21) (Figura 11B) para CT se analizaron en la solución amortiguadora V6.21p con la sonda PB1-FAM de CT. De 50 muestras, 24 dieron negativo (Figura 11A) y 26 dieron positivo (Figura 11B) para CT con la sonda PB1-FAM de CT. La concordancia entre las pruebas de Aptima y de PB-FAM de CT fue del 86%.

Ejemplo 11

25 [0054] En las Figuras 12A y 12B se muestran las gráficas de amplificación generadas en el ensayo múltiple de CT/GC con las sondas PB1-FAM de CT + *porA7*-Alexa546 de GC. El ADN de CT y GC se amplificó en reacciones independientes o conjuntamente en la solución amortiguadora V6.21p en presencia de las sondas PB1-FAM de CT y *porA7*-Alexa546 de GC. Las lecturas se hicieron en los canales de Cy3 (Figura 12A) y de FAM (Figura 12B). El experimento mostró que dos ADN de interés se pueden amplificar y detectar en una reacción simultánea con sondas marcadas con FAM y Alexa546, y que no había reactividad cruzada entre las sondas y los cebadores PB1 de CT y *porA7* de GC.

Ejemplo 12

35 [0055] En el Cuadro 1 se muestra una comparación entre la LAMP con V13 para CT y GC, el CT/GC Aptima y el ensayo múltiple de CT/GC (PB1-FAM de CT + *porA7*-Alexa546 de GC). El ADN extraído de 136 muestras clínicas se analizó con el ensayo múltiple CT/GC-Aptima, los cebadores PB1 de CT y *porA7* de GC en la solución amortiguadora V6.21 que contenía V13 o en una reacción múltiple en la solución amortiguadora V6.21p en presencia de los cebadores PB1 de CT y *porA7* de GC y las sondas PB1-FAM de CT y *porA7*-Alexa546 de GC. En un experimento de control, las muestras también se analizaron en una reacción simple con la sonda *glnA7*-joe de GC. En el Cuadro se muestran las puntuaciones de concordancia entre las pruebas.

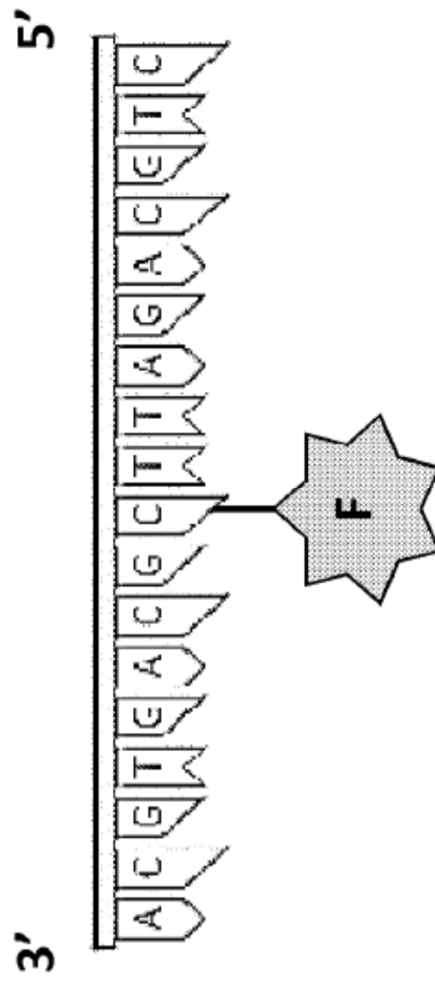
REIVINDICACIONES

1. Un método para detectar una secuencia de un ácido nucleico de interés en una muestra que comprende:
 5 amplificar un ácido nucleico de interés en la muestra mediante amplificación isotérmica mediada por bucle;
 sondear el ácido nucleico amplificado con una sonda que comprende;
 una secuencia de una sonda oligonucleotídica complementaria a una región de una secuencia de un ácido
 10 nucleico de interés, donde dicha secuencia de una sonda oligonucleotídica tiene solamente un marcador
 fluoróforo y dicho marcador está unido a una base de citosina interna y donde dicha secuencia de una sonda
 oligonucleotídica no tiene un terminador en el extremo 3', donde la base de citosina está dispuesta
 sustancialmente de manera central a lo largo de la cadena oligonucleotídica a excepción de las posiciones 1-3
 en el extremo 3' y la posición 1 en el extremo 5'; y
 detectar la presencia del ácido nucleico de interés, donde un incremento en la fluorescencia de la sonda indica
 la presencia del ácido nucleico de interés en la muestra.
- 15 2. El método de la reivindicación 1, donde la secuencia de la sonda oligonucleotídica es una secuencia de ADN y
 la secuencia del ácido nucleico de interés es una secuencia de ADN.
3. El método reivindicado en cualquiera de las reivindicaciones precedentes, donde el fluoróforo comprende uno o
 20 más seleccionados de los siguientes: FAM, JOE, TET, HEX, TAMRA, ROX, ALEXA y ATTO.
4. El método según la reivindicación 3, donde el fluoróforo es FAM, Joe o Alexa546.
5. El método reivindicado en cualquiera de las reivindicaciones precedentes, donde la secuencia de la sonda
 25 oligonucleotídica comprende la siguiente secuencia:
 5' X_n C * X_m 3' (SEC. N.º ID. 1)
 donde n es > 1, m > 3, X es una base nucleotídica; y * es un fluoróforo y
 donde la base nucleotídica se selecciona de entre A, T, C y G,
 n es más de 1 hasta 20, más preferentemente más de 1 hasta 10, y m es más de 3 hasta 20, preferentemente
 30 más de 3 hasta 10.
6. El método reivindicado en cualquiera de las reivindicaciones precedentes, donde la secuencia de la sonda
 oligonucleotídica comprende una o más de las siguientes secuencias:
- SEC. N.º ID. 3: TAAGATAAC[C-FAM]CCGCACGTG
 35 SEC. N.º ID. 5: GCGAACATA [C-ALEXA546] CAGCTATGATCAA
 o
 SEC. N.º ID. 6: ATGTTCA [C-JOE] CATGGCGGAG
7. El método según las reivindicaciones 1-5, donde el ácido nucleico de interés procede de un microorganismo, un
 40 hongo, una levadura o un virus.
8. El método reivindicado en cualquiera de las reivindicaciones precedentes, donde el ácido nucleico de interés
 procede de *Chlamydia trachomatis* o *Neisseria gonorrhoeae*.
- 45 9. Un método para diagnosticar una infección por clamidia y/o gonorrea en un paciente, que comprende:
 proporcionar una muestra obtenida a partir del paciente;
 llevar a cabo un método según cualquiera de las reivindicaciones 1-8; y
 detectar la presencia de un ácido nucleico obtenido a partir de *Chlamydia trachomatis* y/o *Neisseria gonorrhoeae*,
 50 donde un incremento en la fluorescencia de la sonda indica la presencia de una infección por *Chlamydia*
 trachomatis y/o *Neisseria gonorrhoeae*.
10. El método de la reivindicación 9, donde a la muestra se añade un único tipo de sonda específica para un ácido
 nucleico procedente de *Chlamydia trachomatis* o *Neisseria gonorrhoeae*.
- 55 11. El método de la reivindicación 9, donde se añaden al menos dos sondas distintas a la muestra, donde una primera
 sonda se marca con un primer marcador fluorescente y es específica para sondear el ácido nucleico de
 Chlamydia Trachomatis, y una segunda sonda se marca con un marcador fluorescente diferente al de la primera
 sonda y es específica para sondear el ácido nucleico de *Neisseria gonorrhoeae*.
- 60 12. El método de cualquiera de las reivindicaciones anteriores, donde las sondas se proporcionan en un sistema de
 solución amortiguadora que comprende dNTP a una concentración de 1-10 mM, una o más sales a una
 concentración de cada sal de 2-20 mM, Tris pH 8,8 a una concentración de 10-100 mM, trehalosa a una
 concentración de 10-100 mM, polimerasa Bst en una cantidad de 1U-12 U y 1,2 propanodiol al 0,01% -1%.
- 65 13. El método de la reivindicación 12, donde la sal o las sales se seleccionan del grupo que consiste en KCl,
 (NH₄)₂SO₄ y MgSO₄.

- 5 14. Una sonda para la amplificación isotérmica de ácidos nucleicos que comprende una secuencia de una sonda oligonucleotídica complementaria a una región de una secuencia de un ácido nucleico de interés, donde dicha secuencia de una sonda oligonucleotídica tiene solamente un marcador fluoróforo y dicho marcador se une a una base de citosina interna y donde dicha secuencia de una sonda oligonucleotídica no tiene un terminador en el extremo 3', donde la base de citosina está dispuesta sustancialmente de manera central a lo largo de la cadena oligonucleotídica, a excepción de las posiciones 1-3 en el extremo 3' y la posición 1 en el extremo 5'; donde la sonda comprende una o más de las siguientes secuencias:
- 10 SEC. N.º ID. 3: TAAGATAAC[C-FAM]CCGCACGTG
SEC. N.º ID. 5: GCGAACATA [C-ALEXA546] CAGCTATGATCAA
o
SEC. N.º ID. 6: ATGTTCA [C-JOE] CATGGCGGAG
- 15 15. Un kit para detectar un ácido nucleico de interés conforme al método de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 13 que comprende una sonda según se especifica en un método de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 13 o según se reivindica en la reivindicación 14, una solución amortiguadora como reactivo para la amplificación isotérmica mediada por bucle, una enzima, dNTP y uno o más cebadores para la amplificación isotérmica mediada por bucle.
- 20 16. El kit según la reivindicación 15, que además comprende un control positivo y negativo.
- 25 17. El kit de la reivindicación 16, donde la solución amortiguadora como reactivo comprende dNTP a una concentración de 1-10 mM, una o más sales a una concentración de 2-20 mM, Tris pH 8,8 a una concentración de 10-100 mM, trehalosa a una concentración de 10-100 mM, polimerasa Bst en una cantidad de 1U-12 U y 1,2 propanodiol al 0,01%-1%.
18. El kit de la reivindicación 17, donde una o más sales se seleccionan del grupo que consiste en KCl, (NH₄)₂SO₄ y MgSO₄.

Figura 1

Esquema de la sonda de ADN MAST



5' T G C A C T G C G A A T C T G C A G 3'

Figura 2A

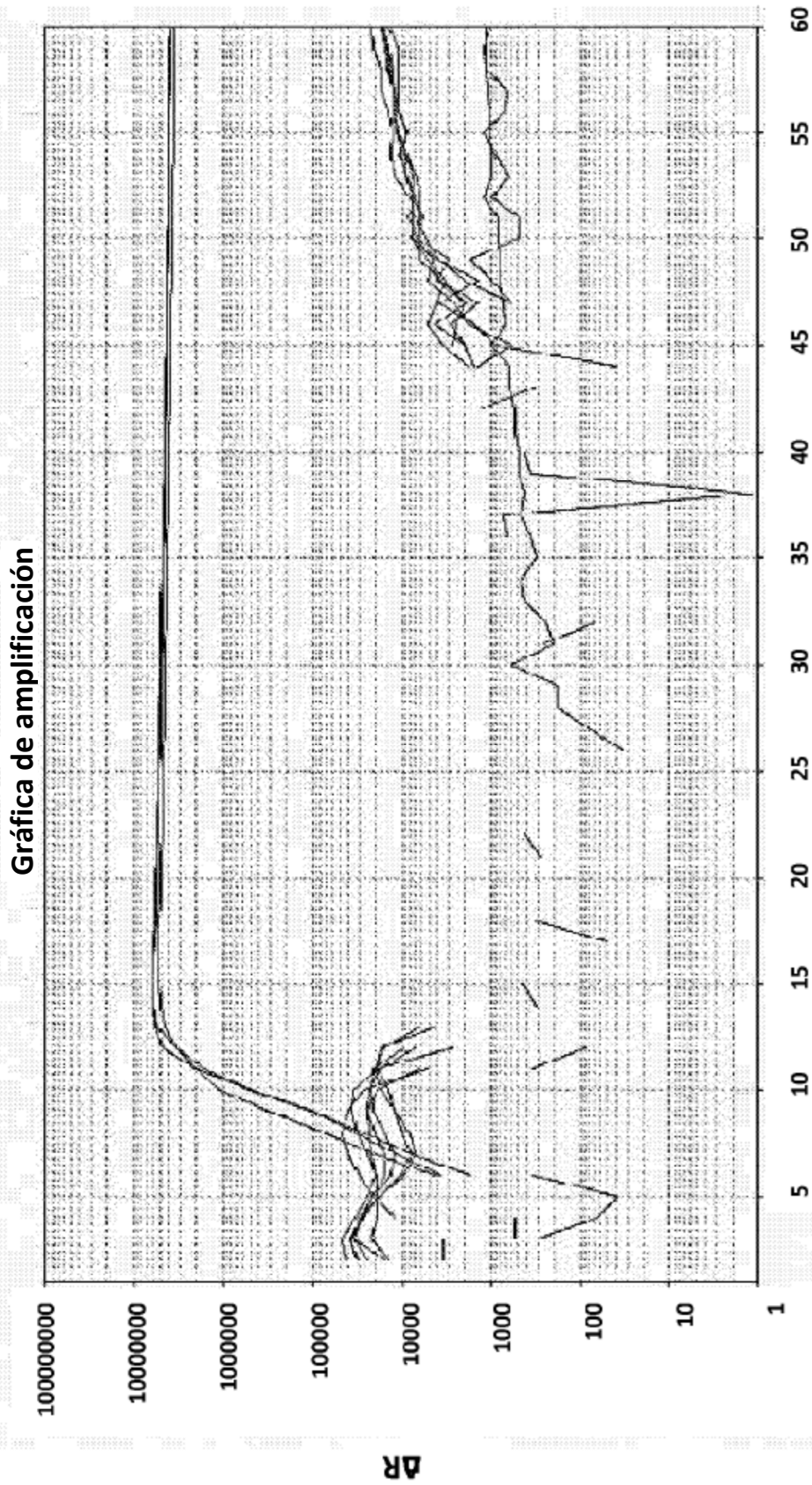


Figura 2B

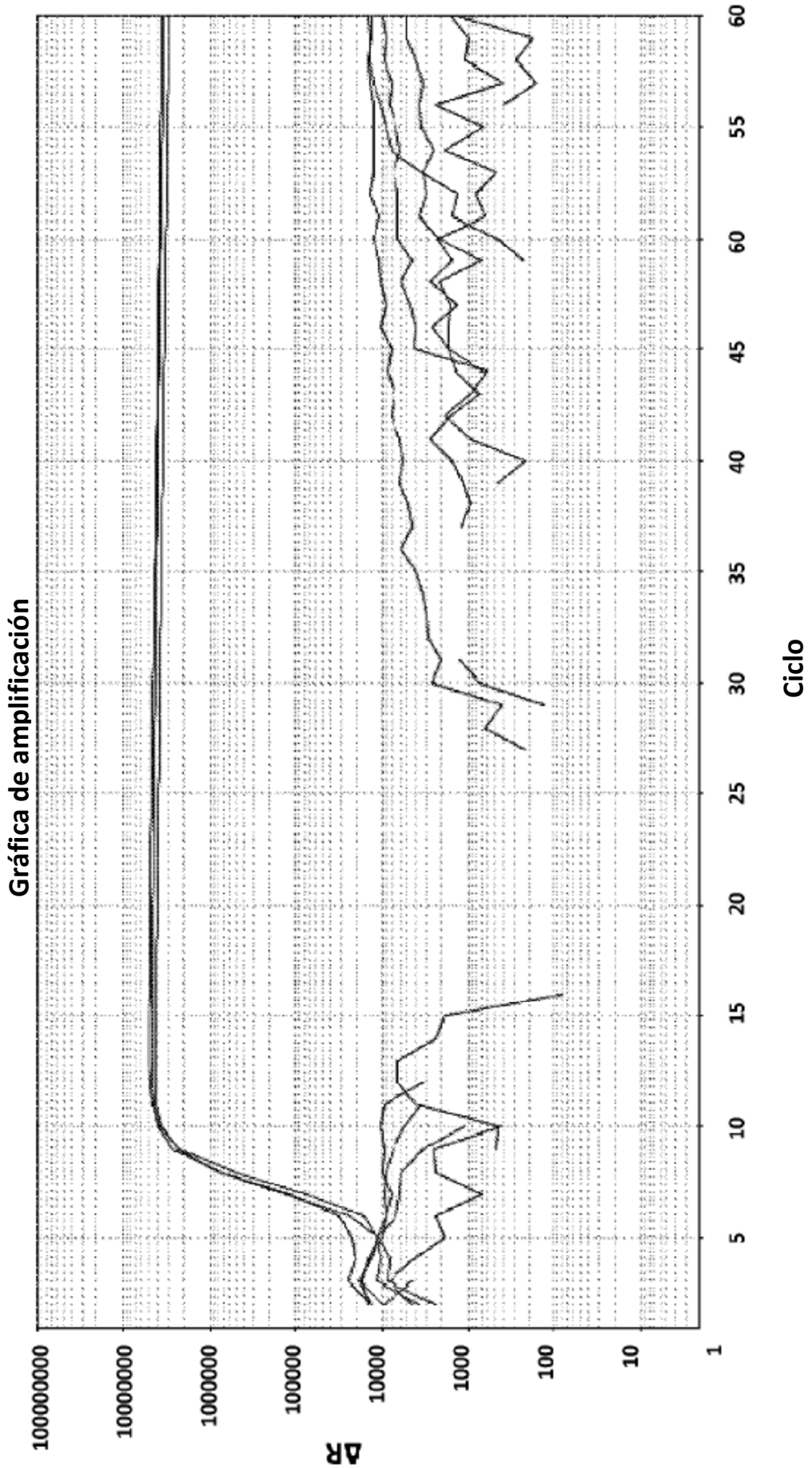


Figura 2

Gráfica de amplificación

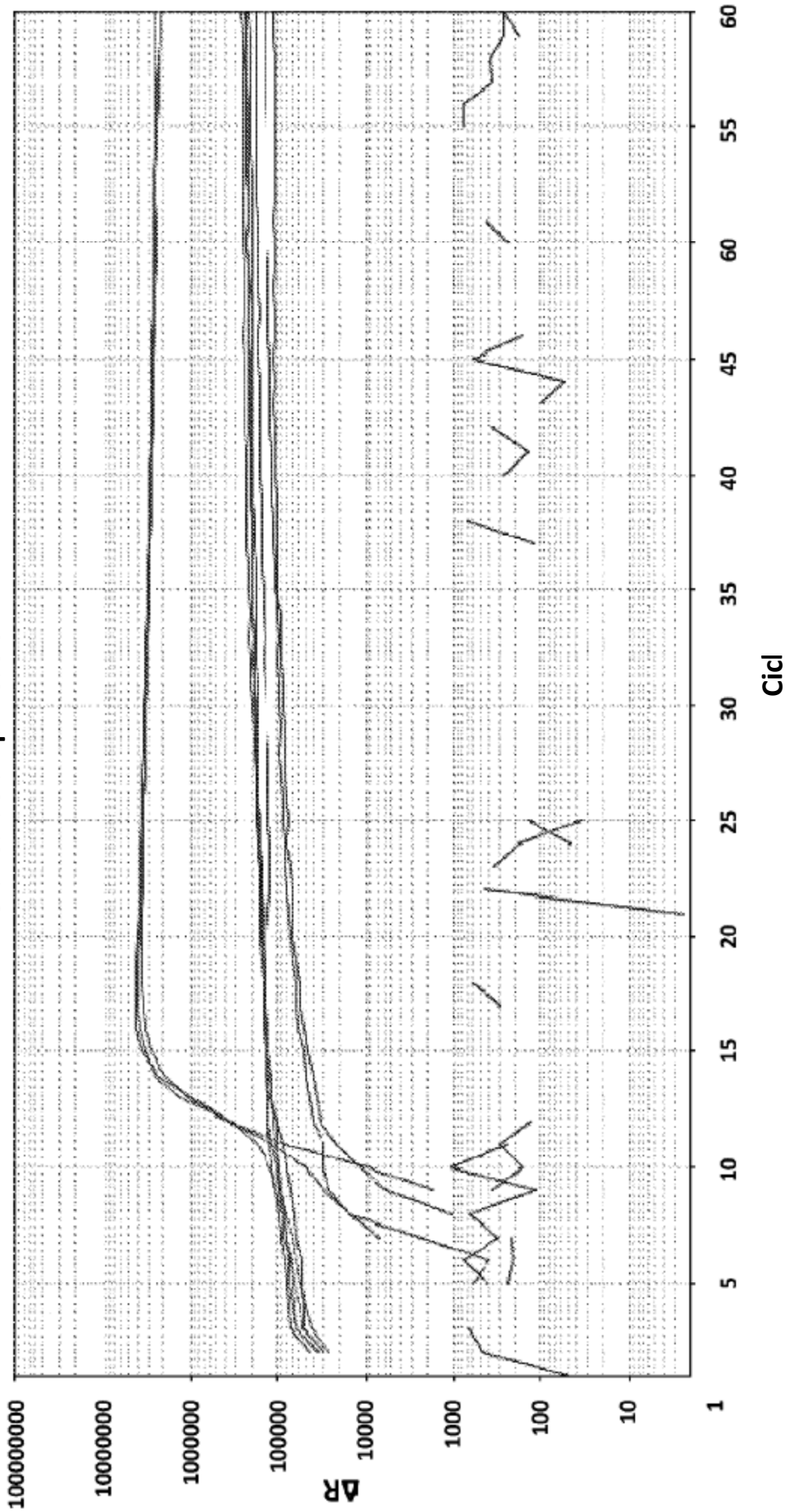


Figura 2D

Gráfica de amplificación

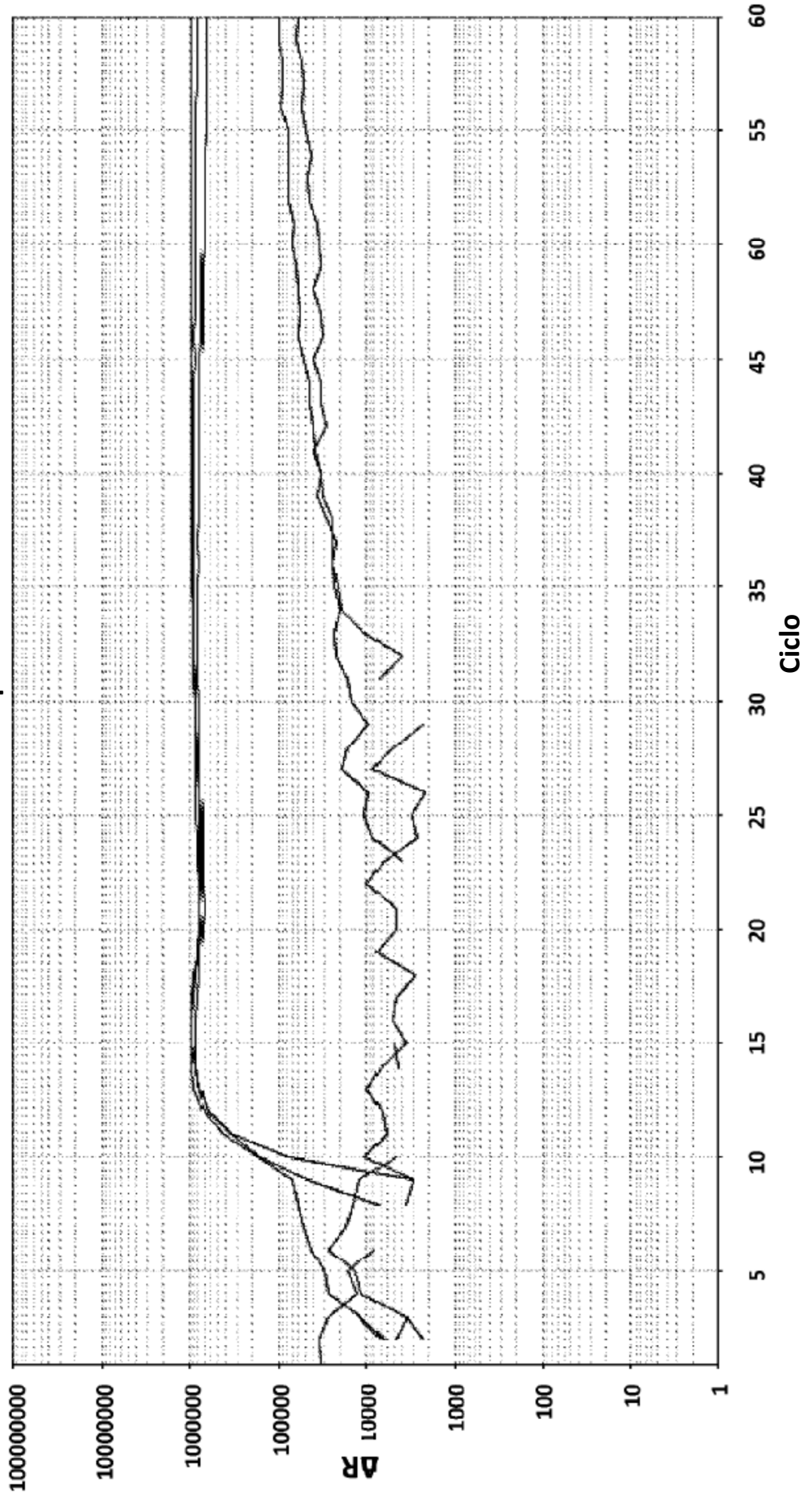


Figura 2E

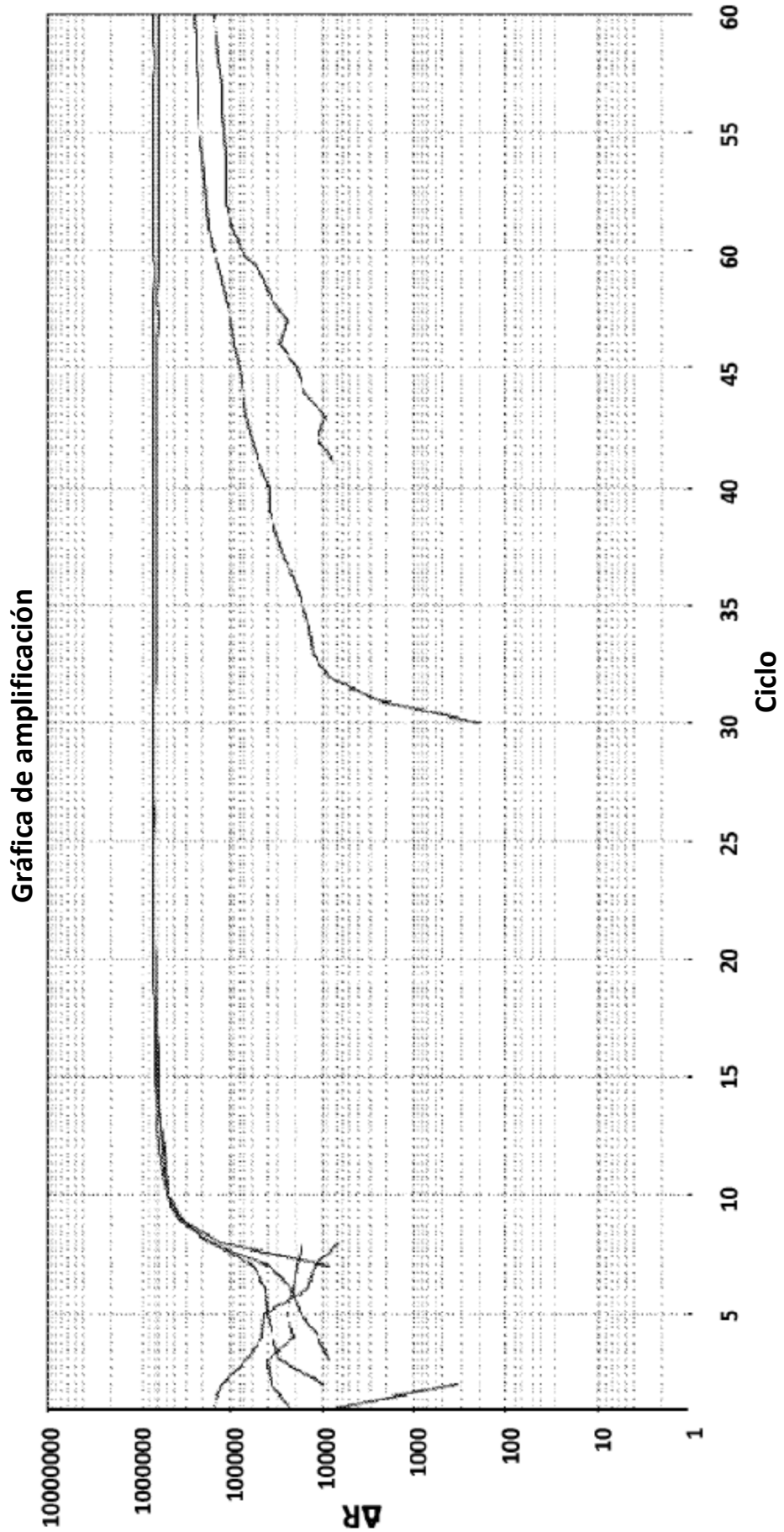


Figura 2F

Gráfica de amplificación

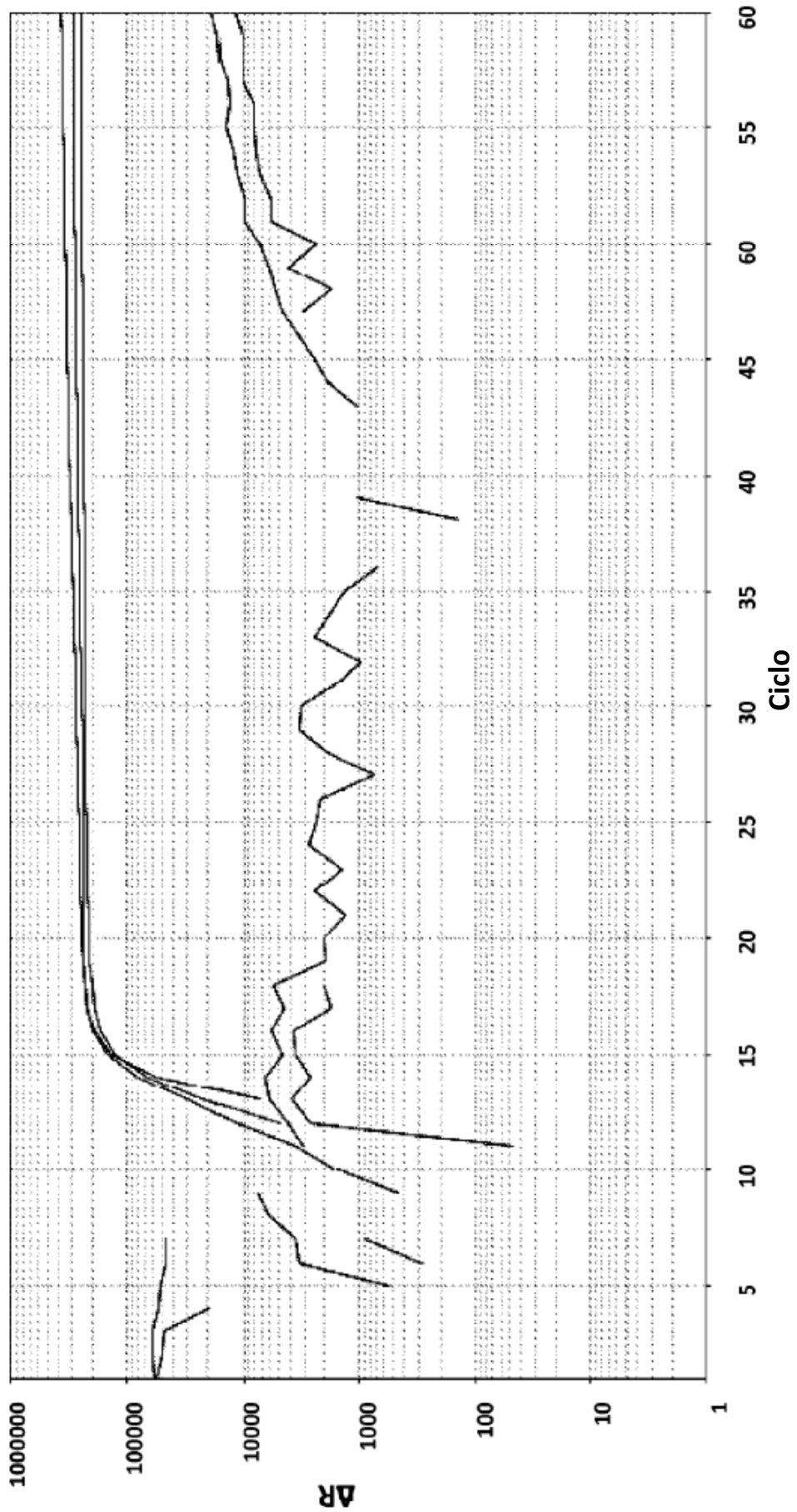


Figura 3A

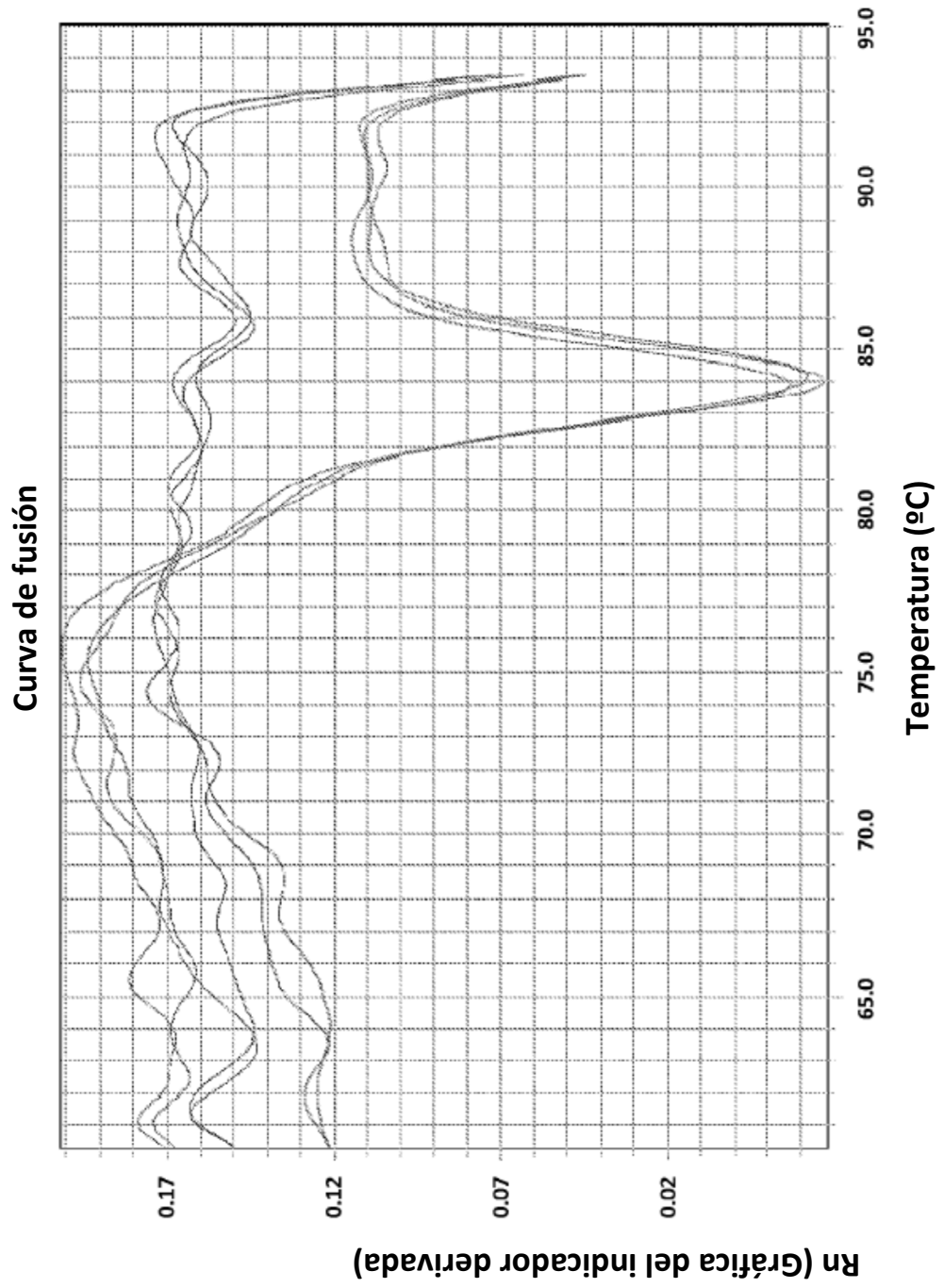


Figura 3B

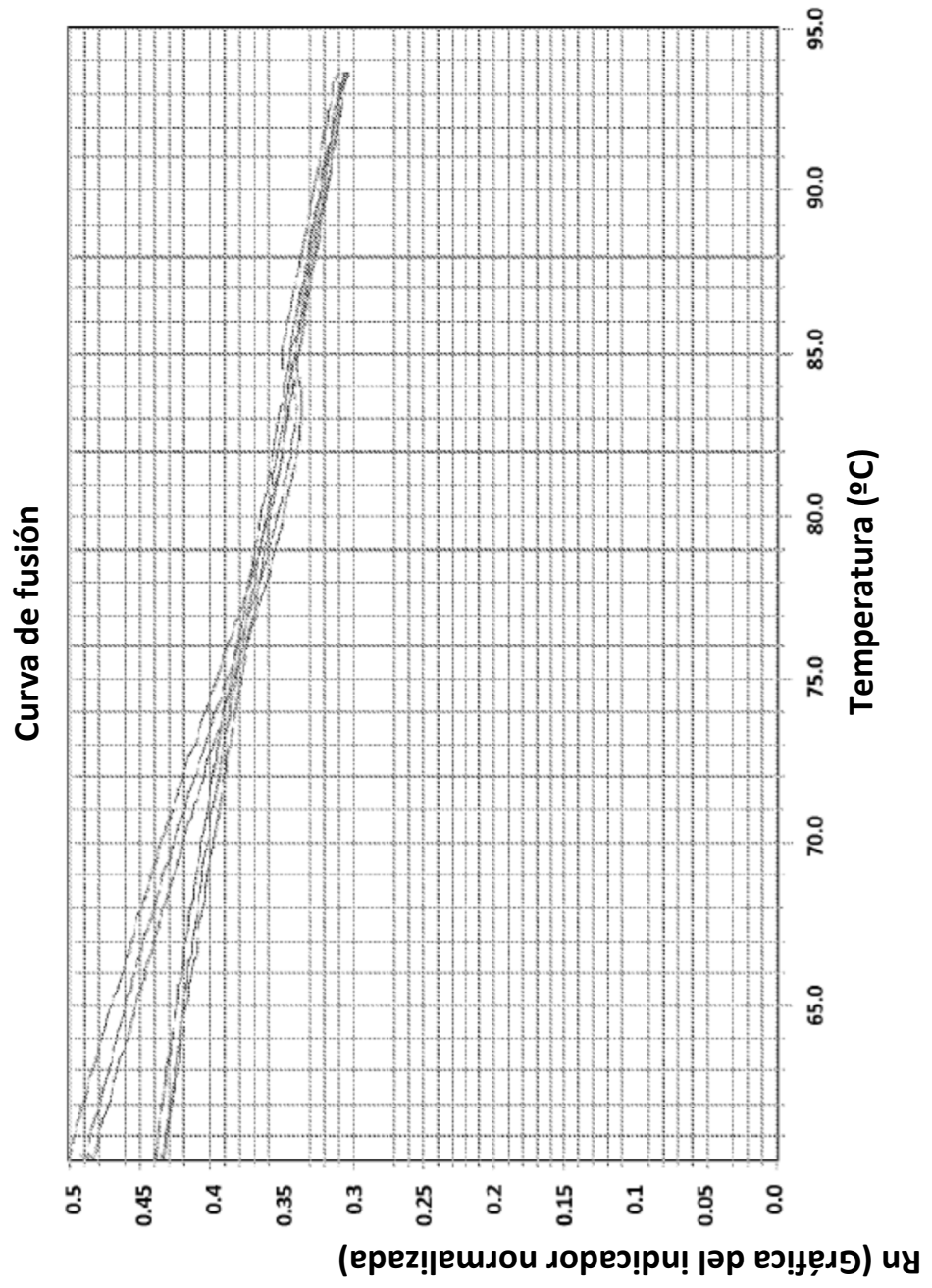


Figura 4A

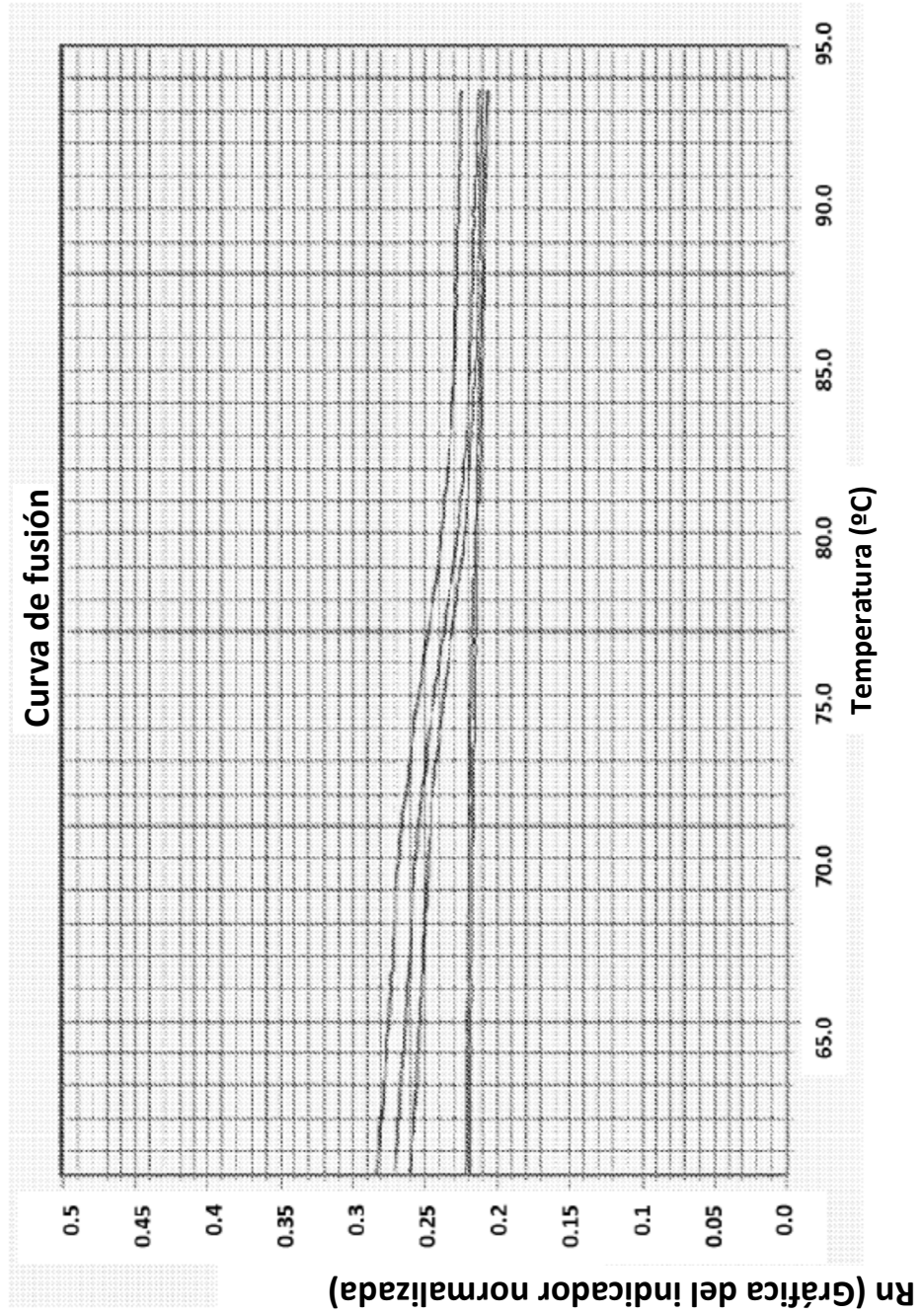


Figura 4B

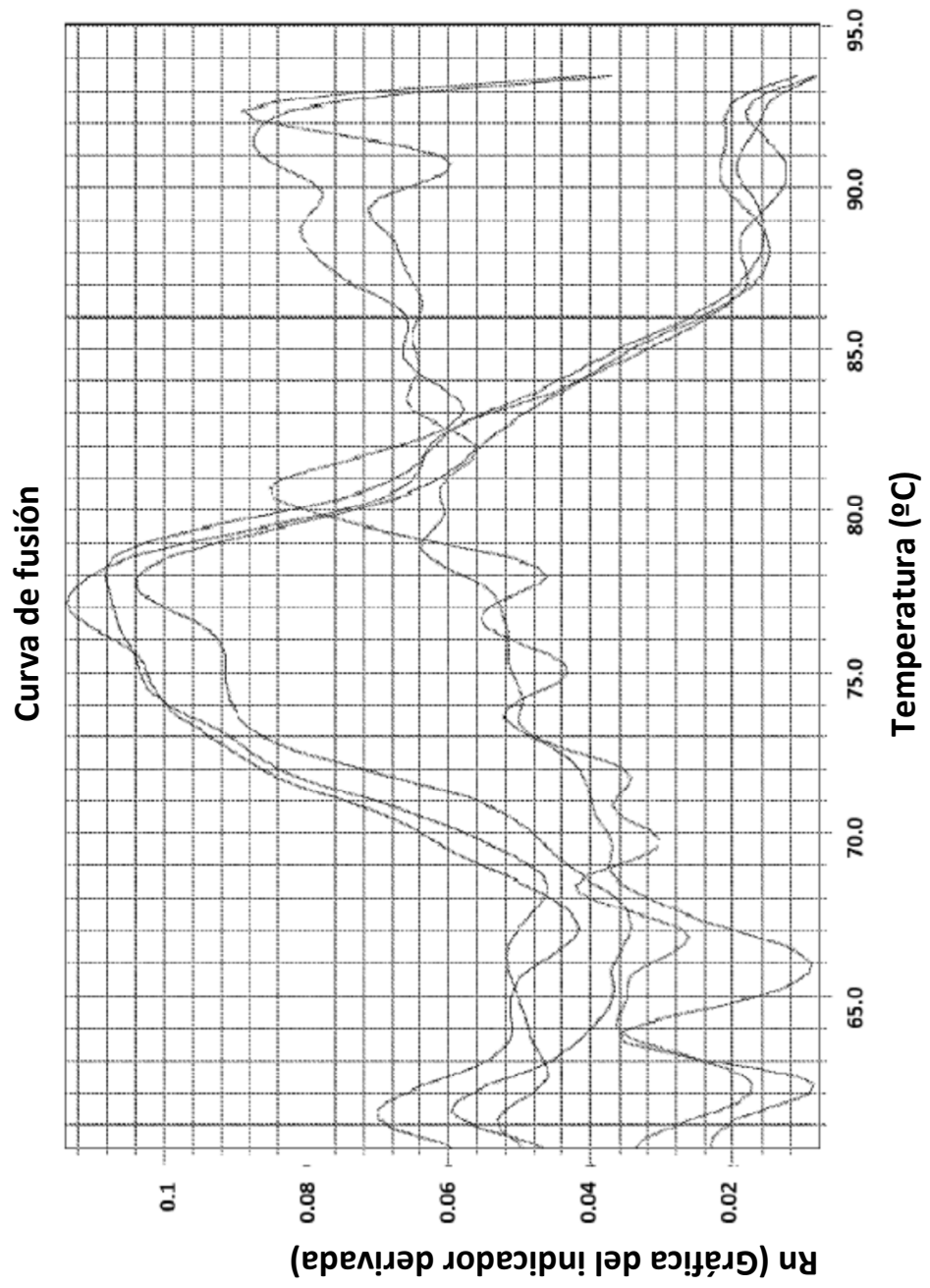


Figura 5A

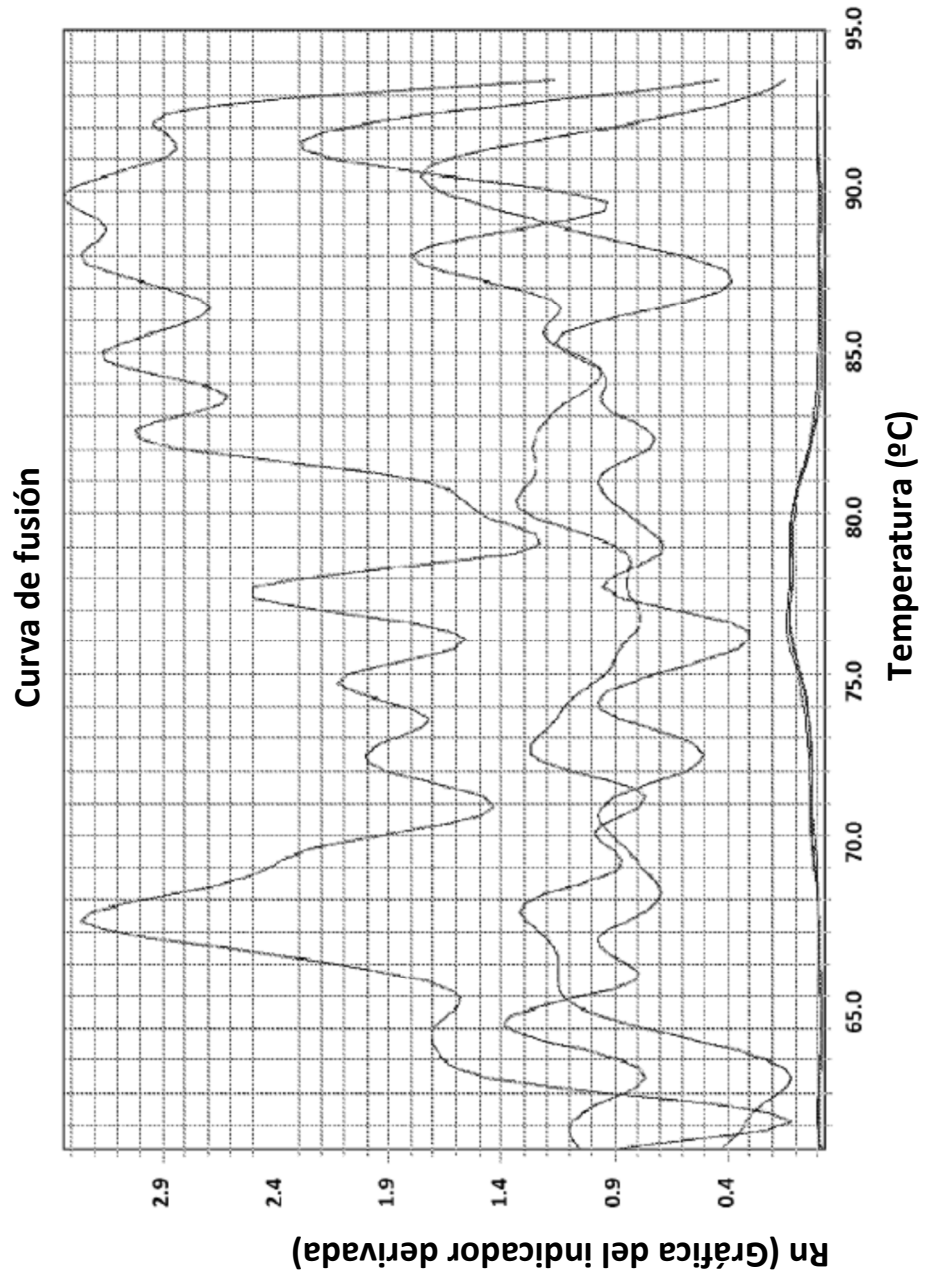


Figura 5B

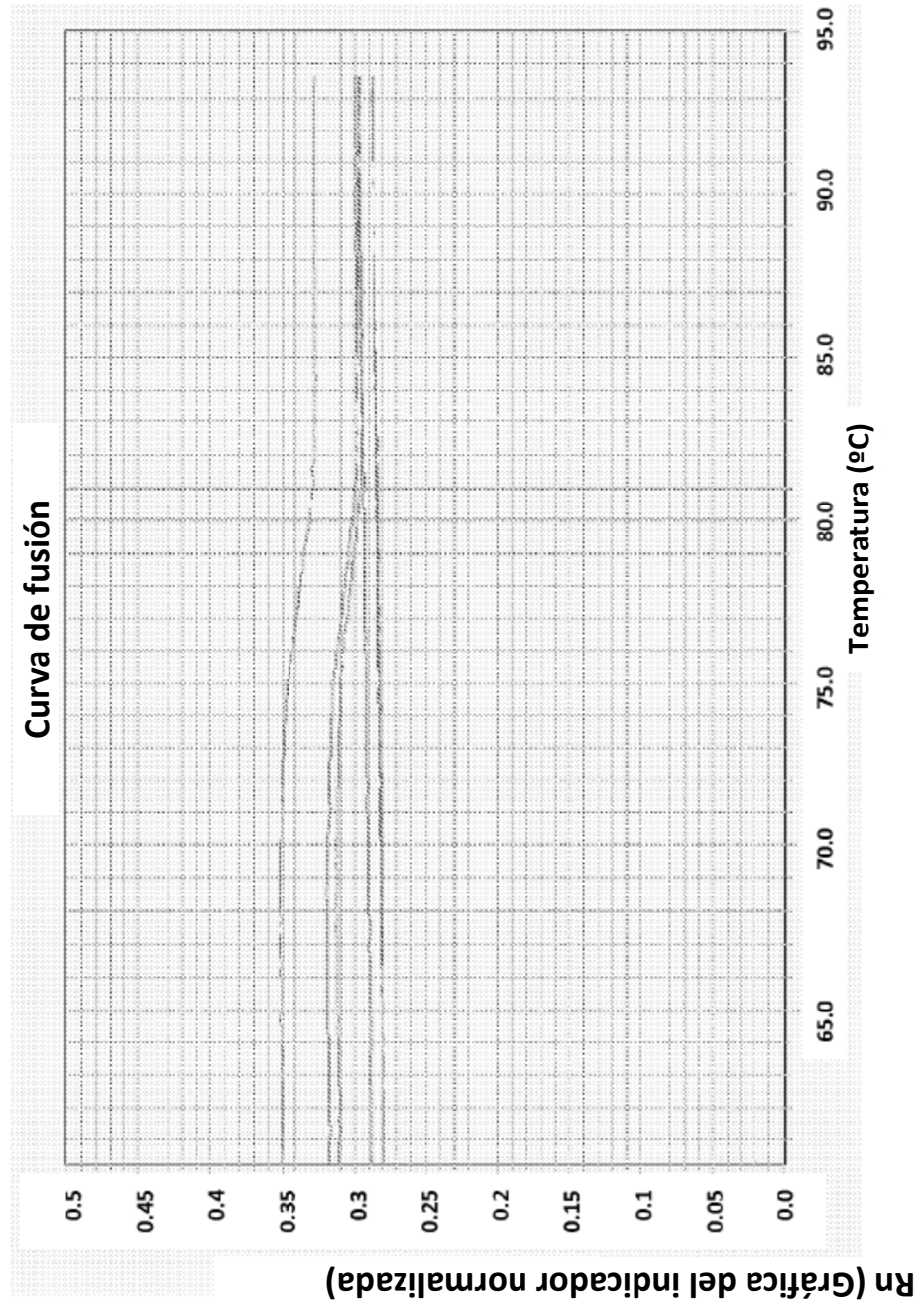


Figura 6A

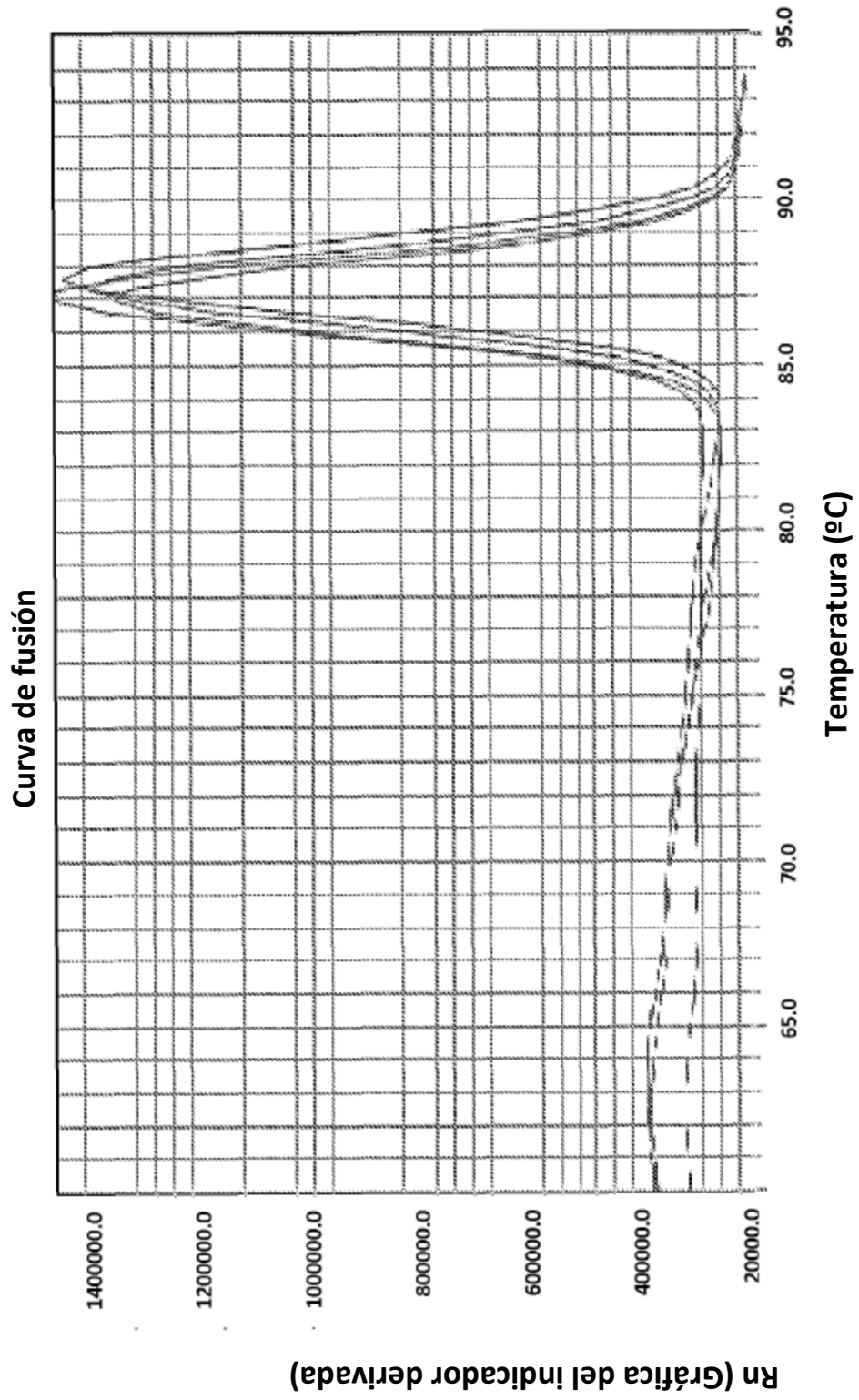


Figura 6B

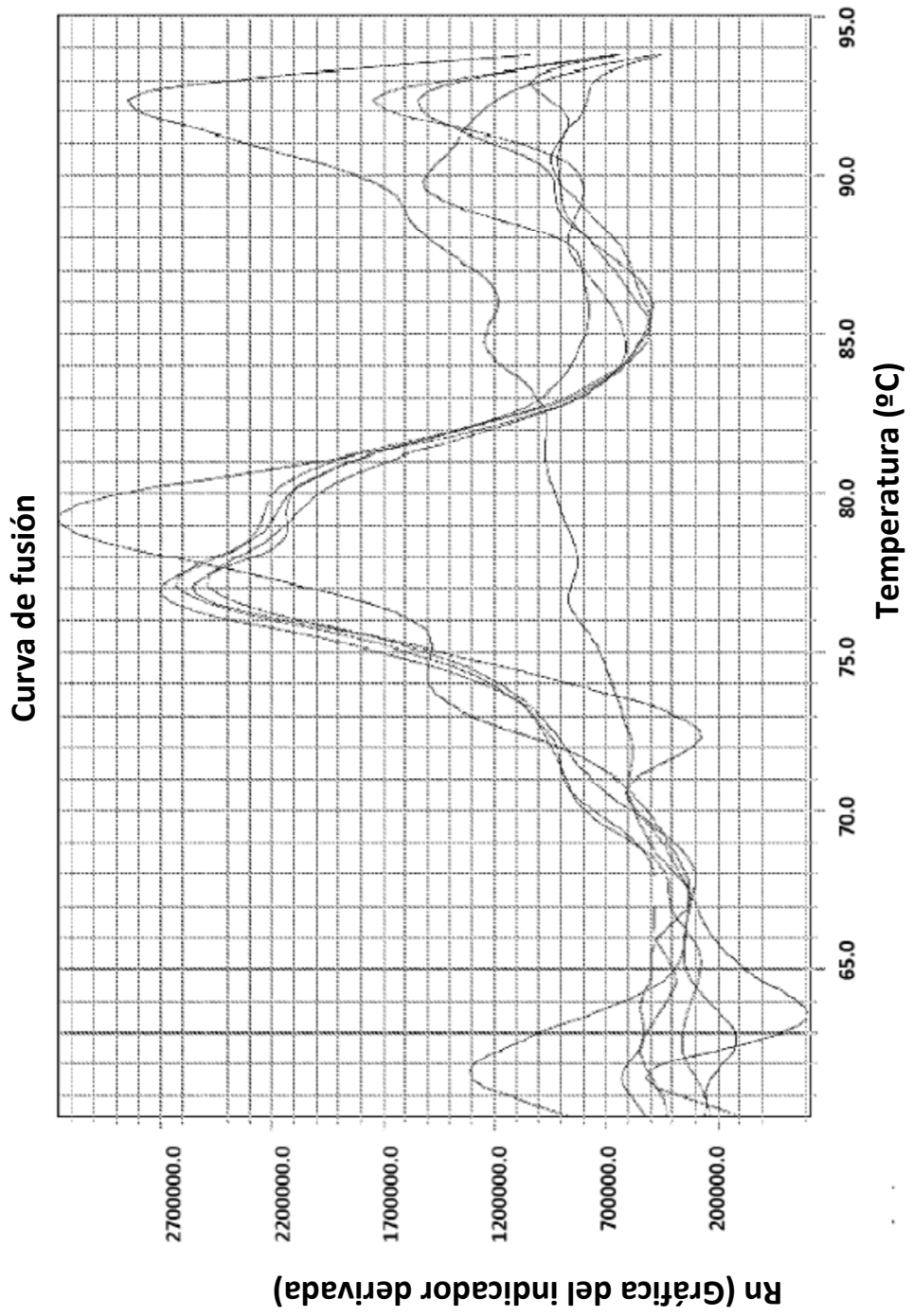


Figura 6C

Gráfica de amplificación

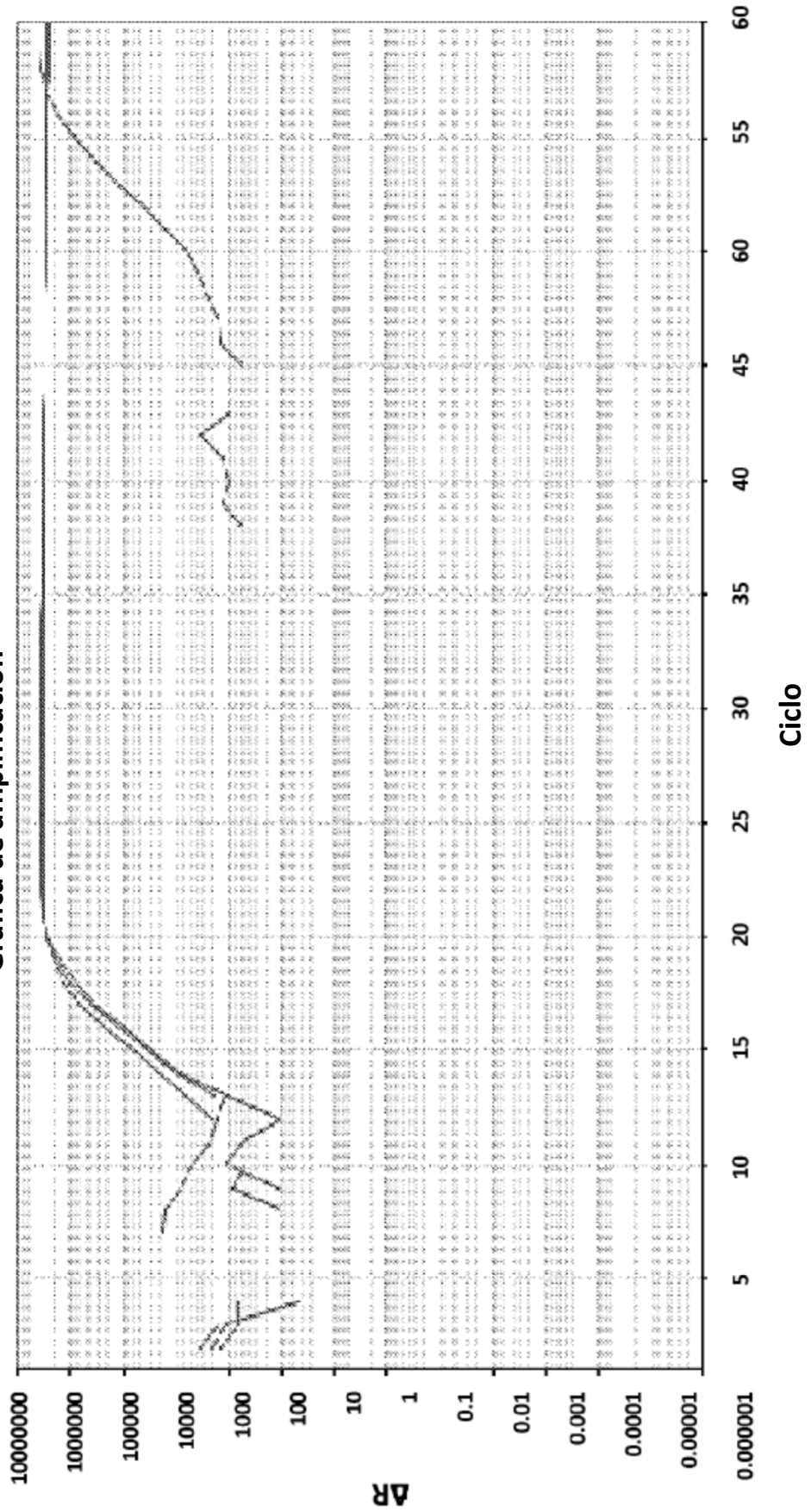


Figura 6D

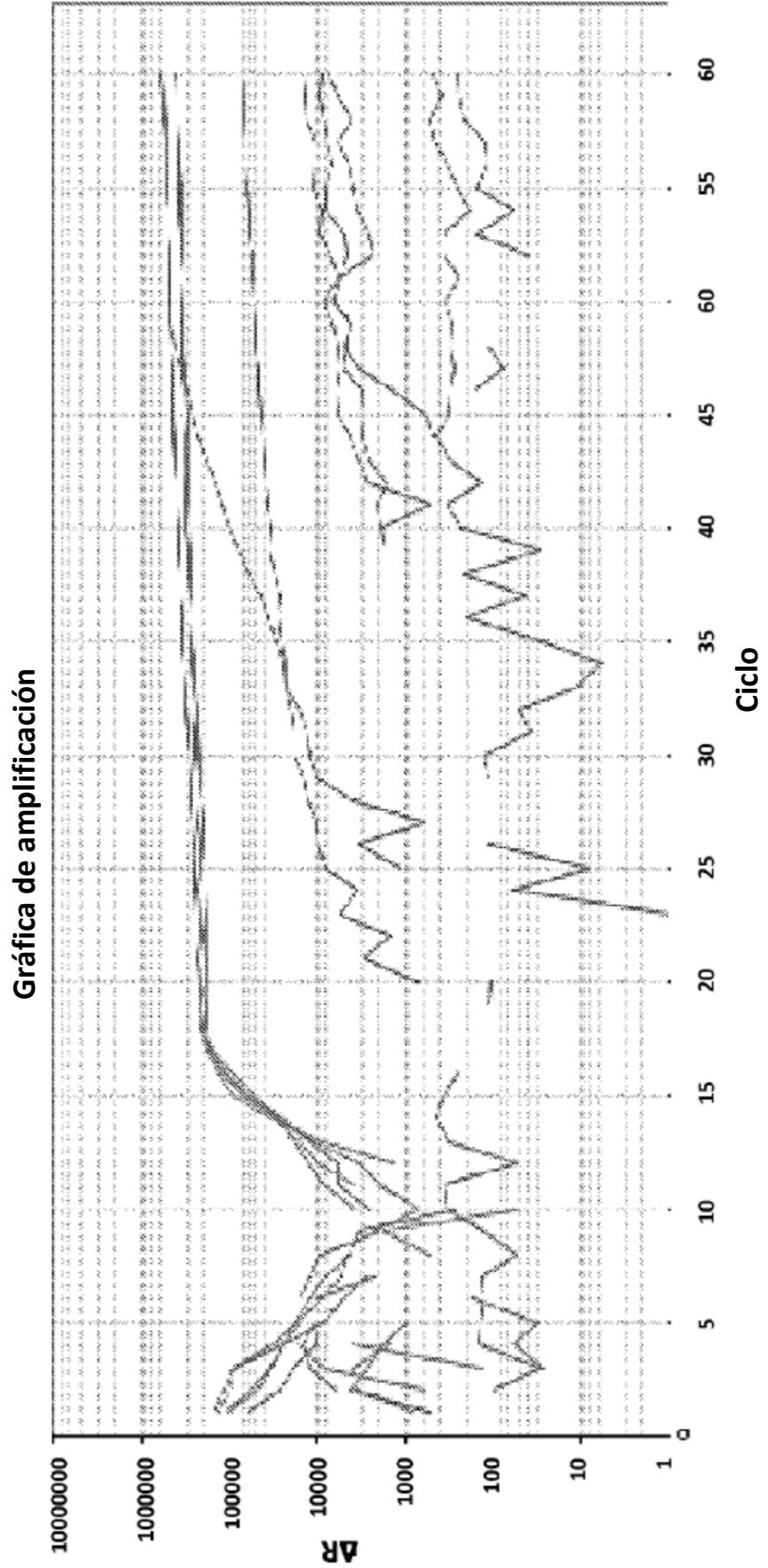


Figura 7
Gráfica de componentes múltiples

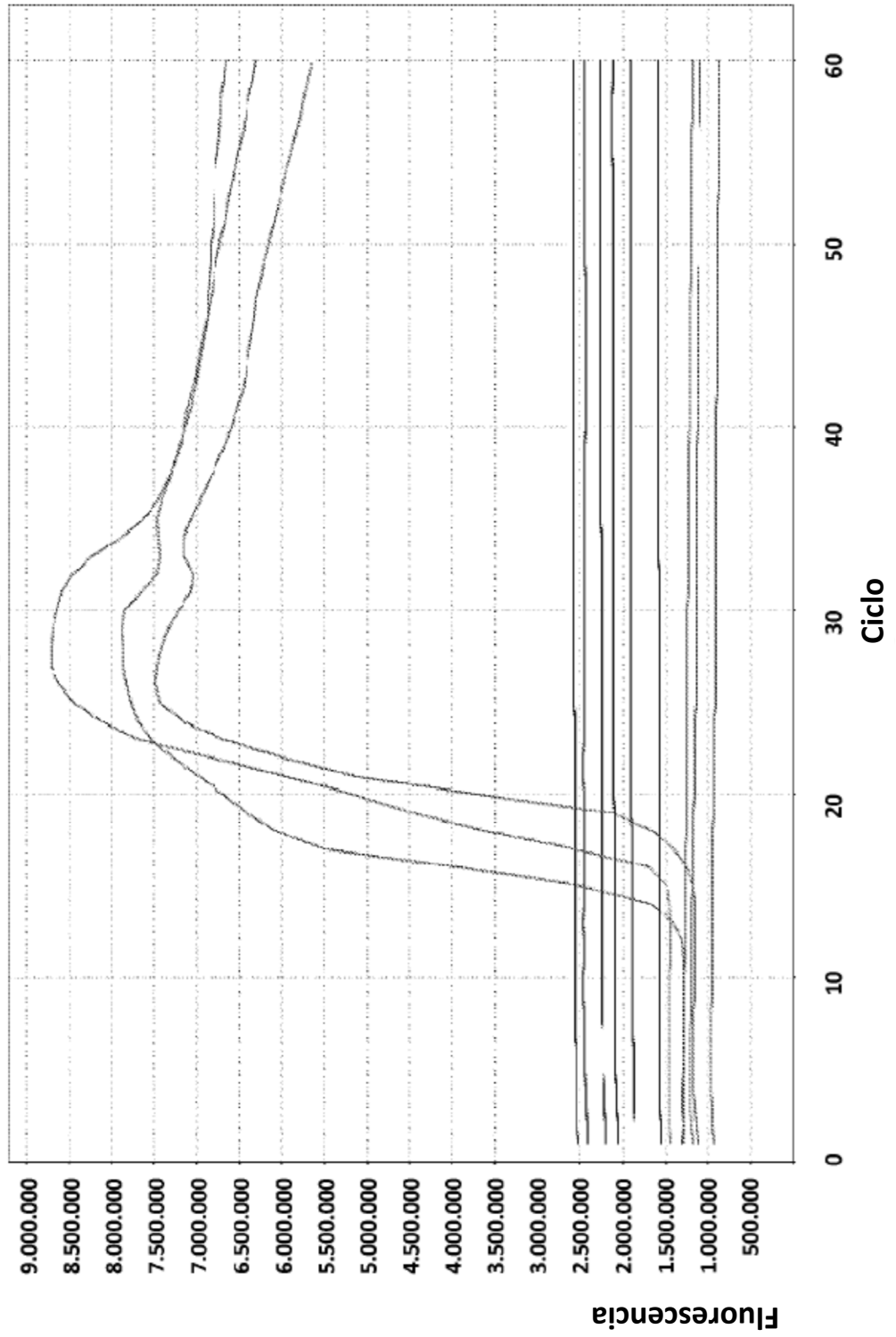


Figura 8A
Gráfica de componentes múltiples

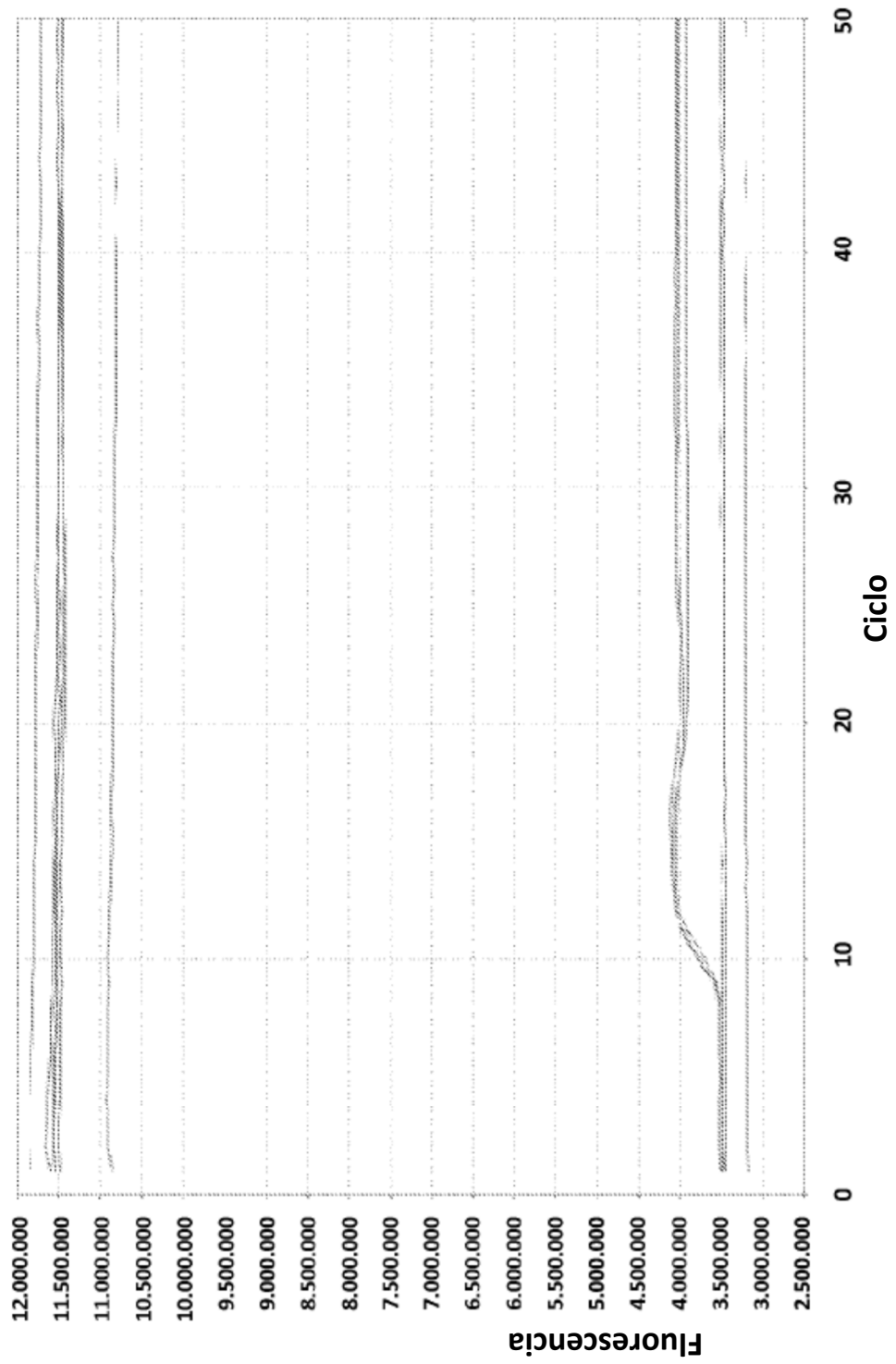


Figura 8B
Gráfica de componentes múltiples

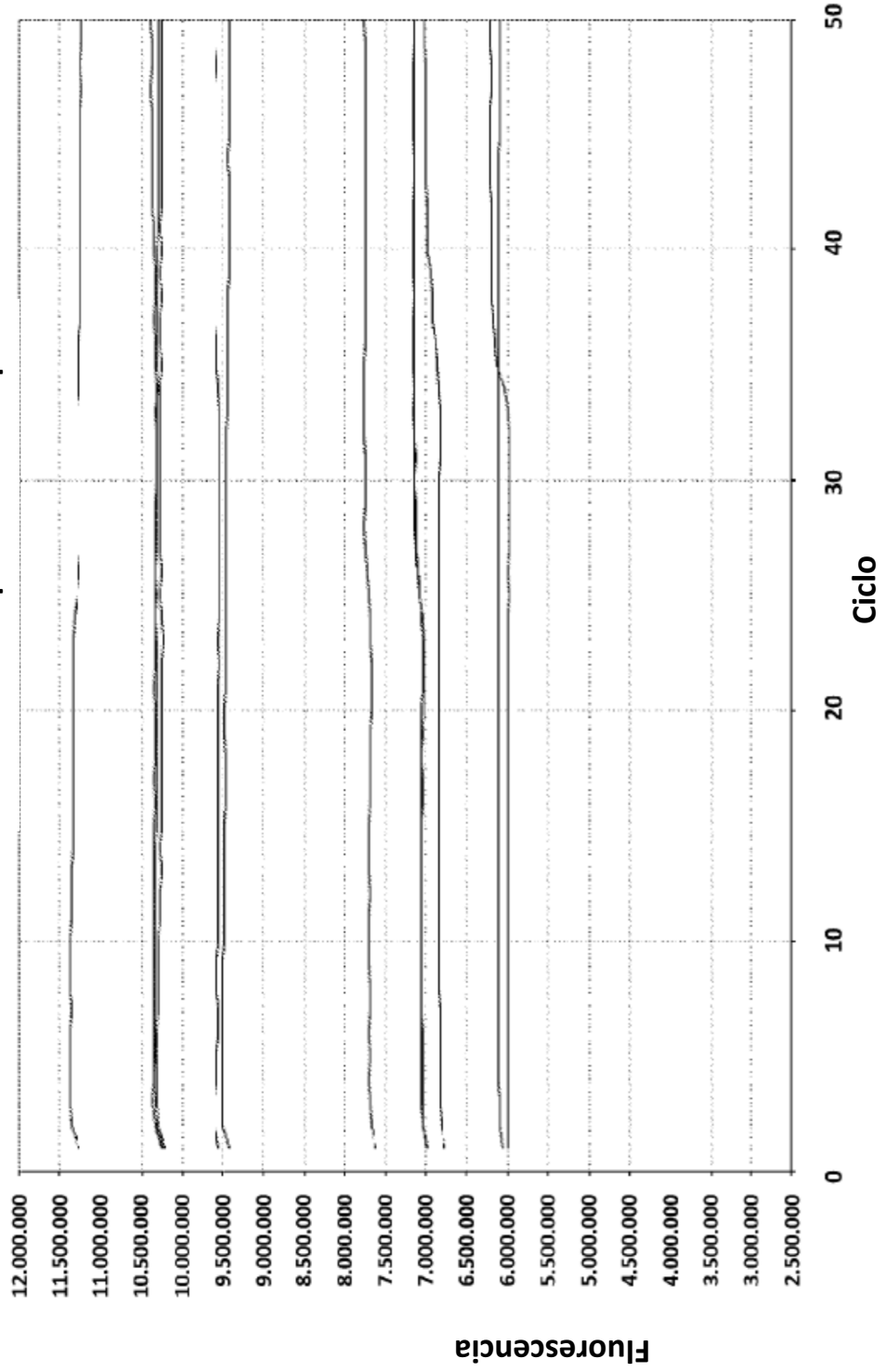


Figura 9A
Gráfica de componentes múltiples

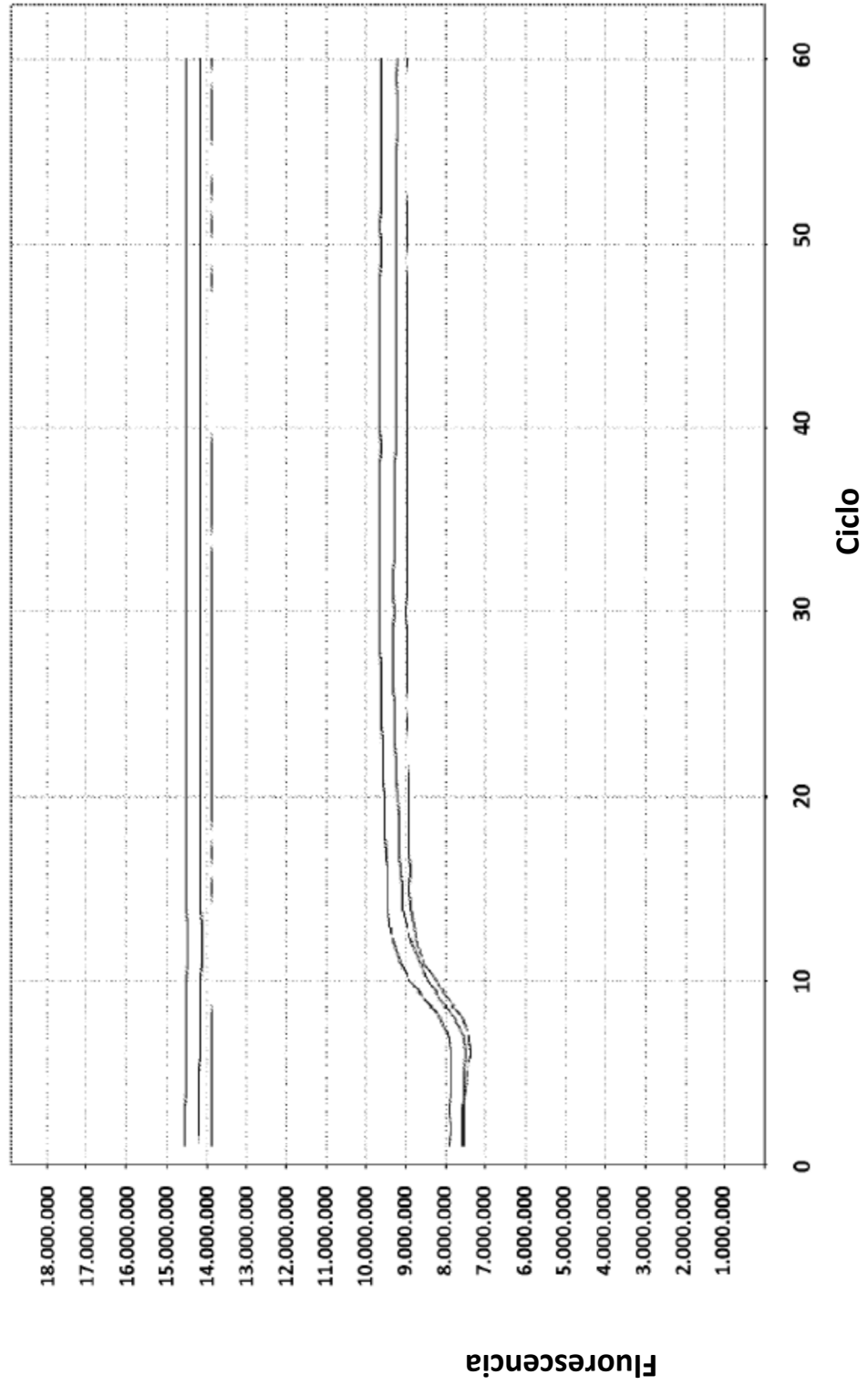


Figura 9B

Gráfica de amplificación

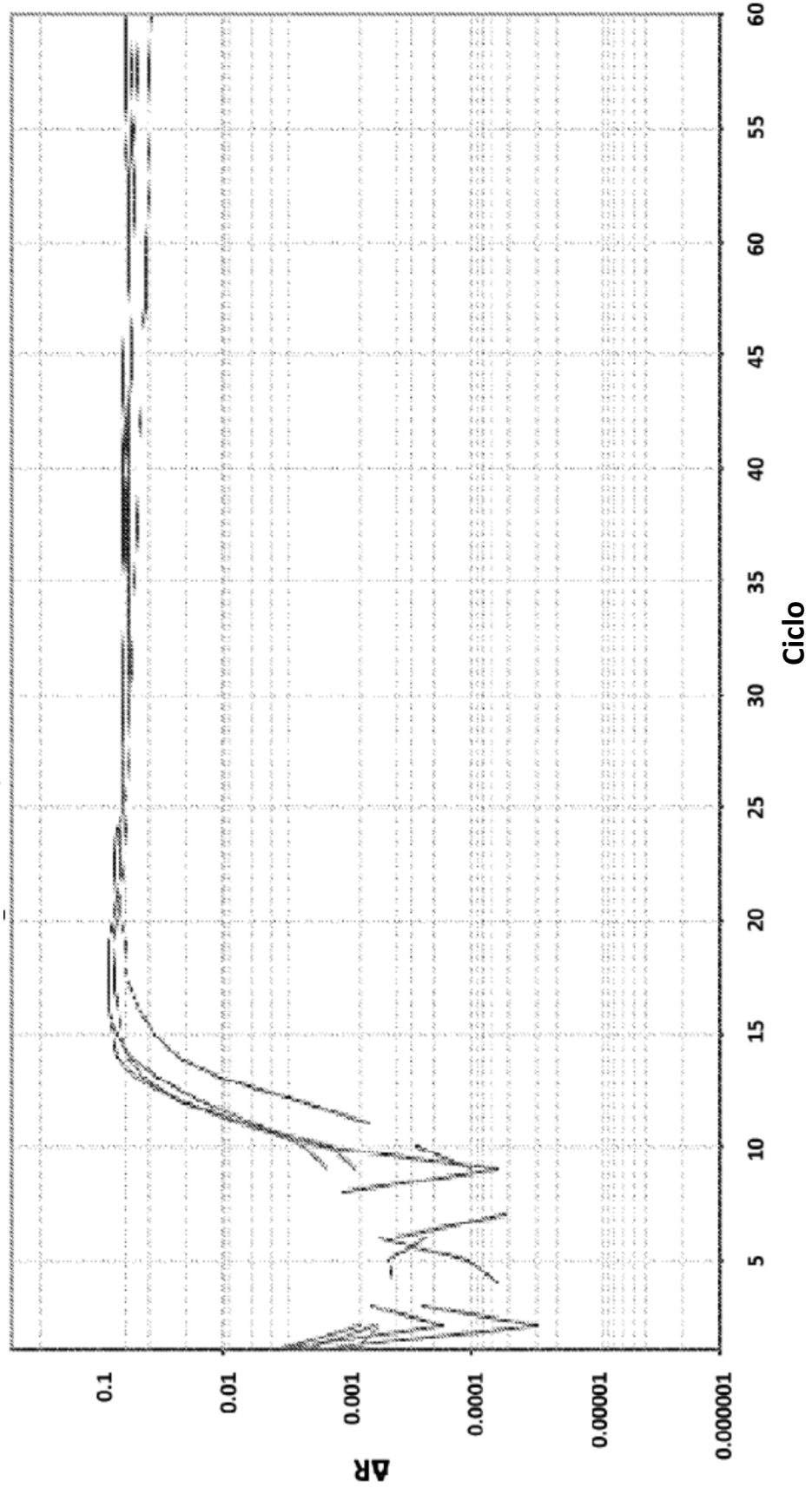


Figura 9C

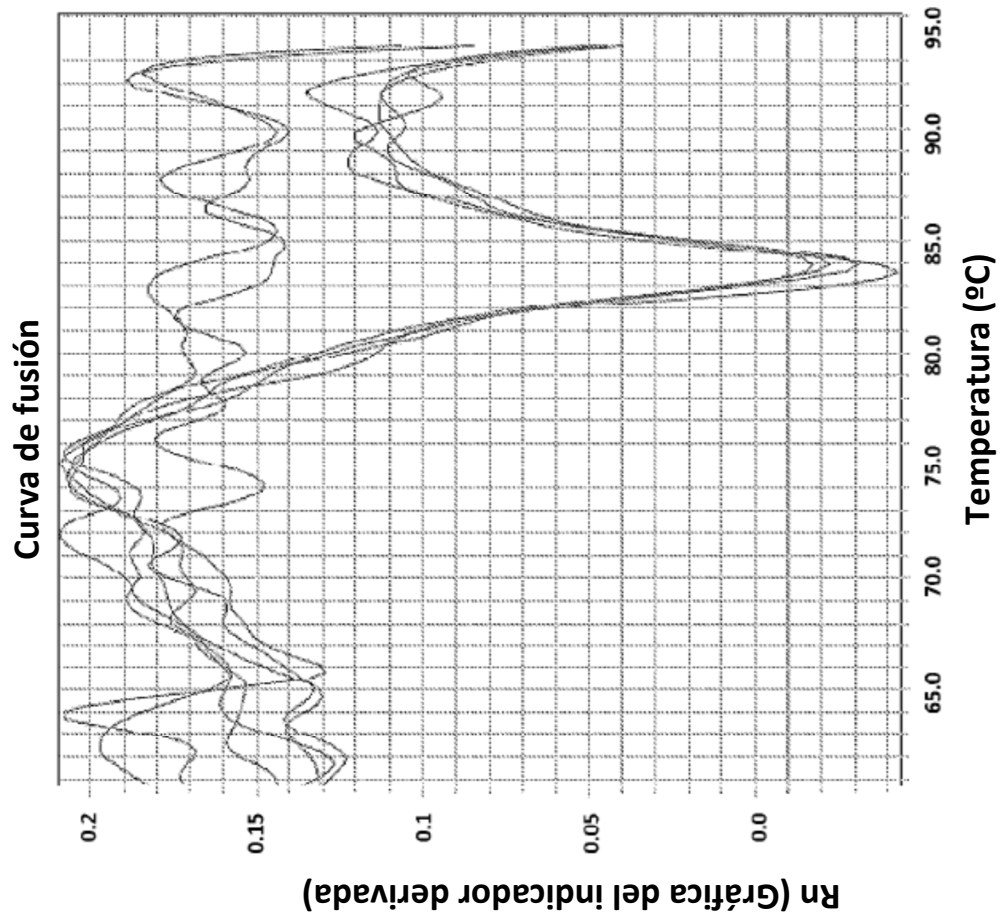


Figura 10A
Gráfica de amplificación

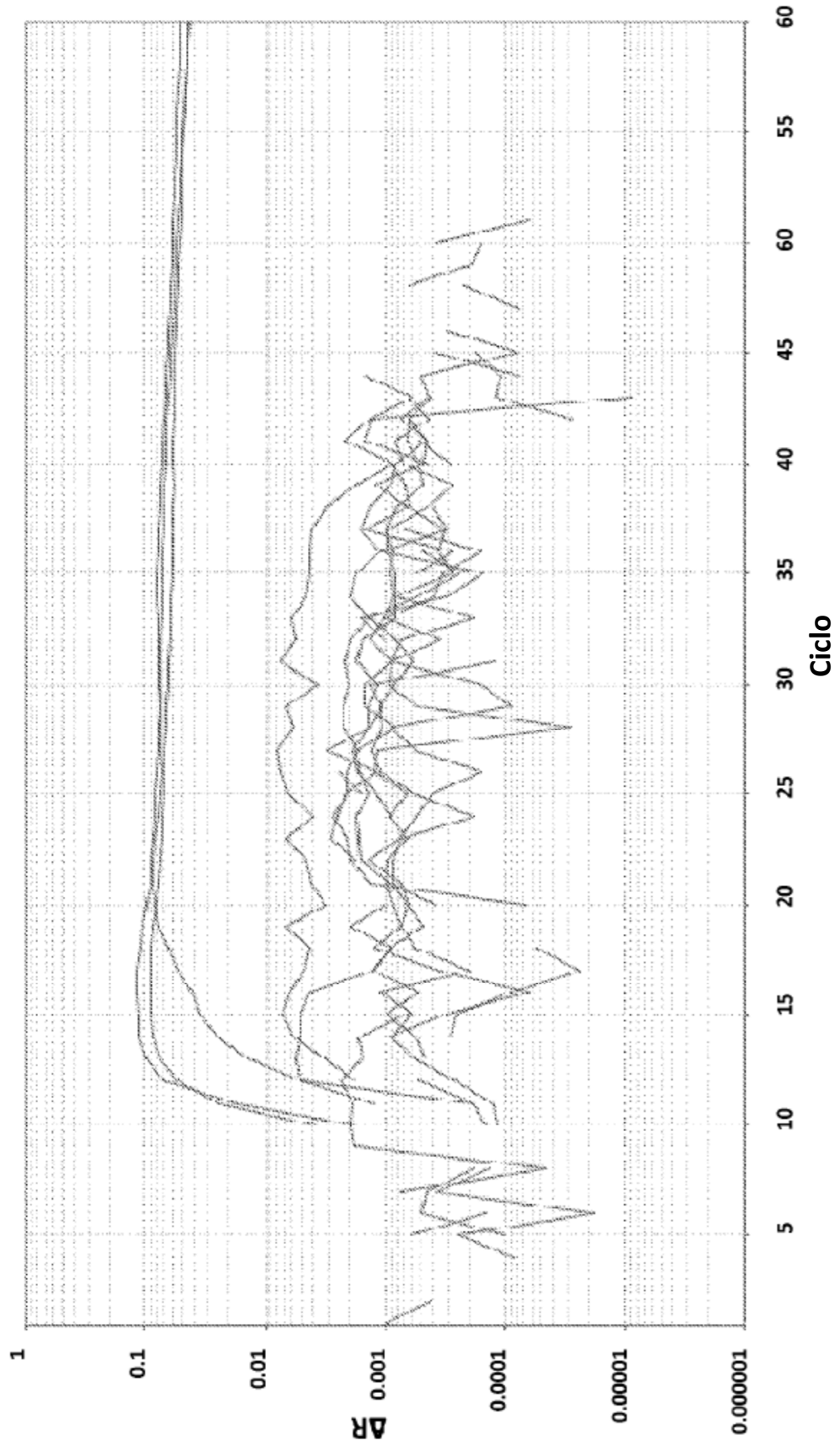


Figura 10B
Gráfica de amplificación

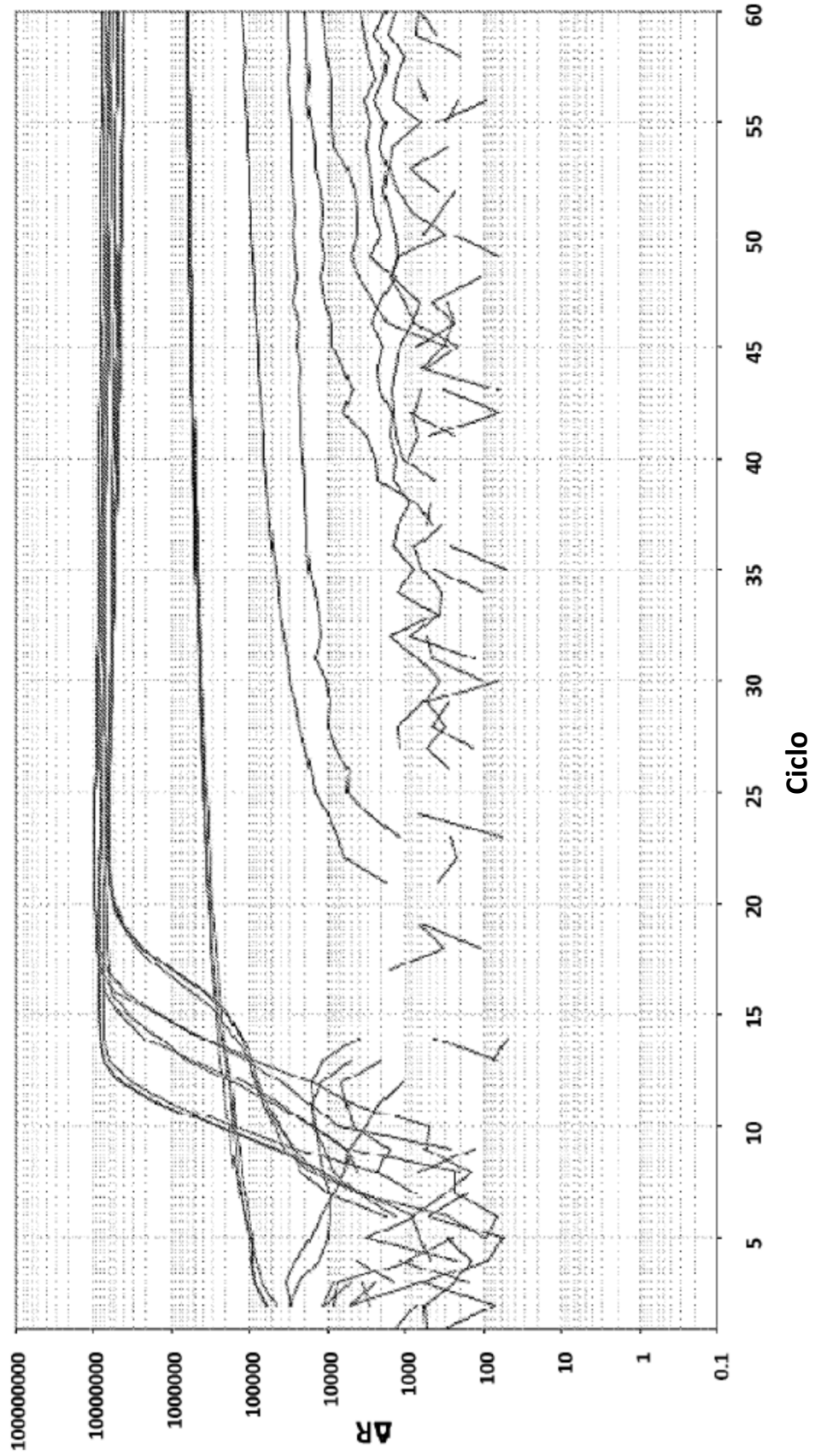


Figura 10C

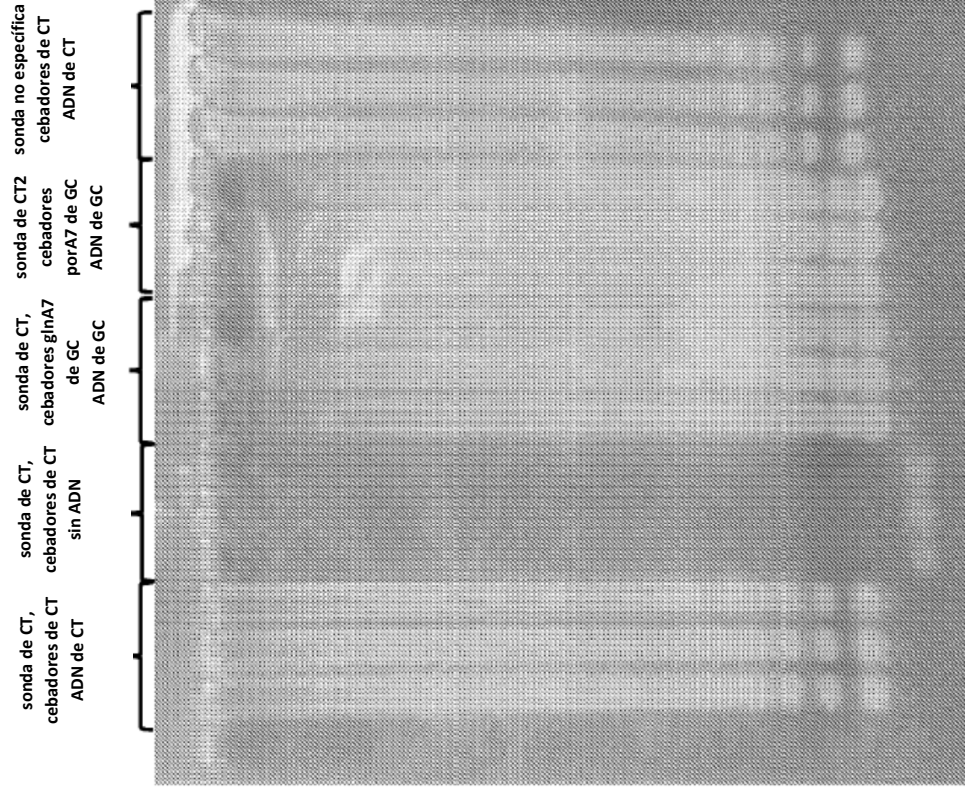


Figura 11A

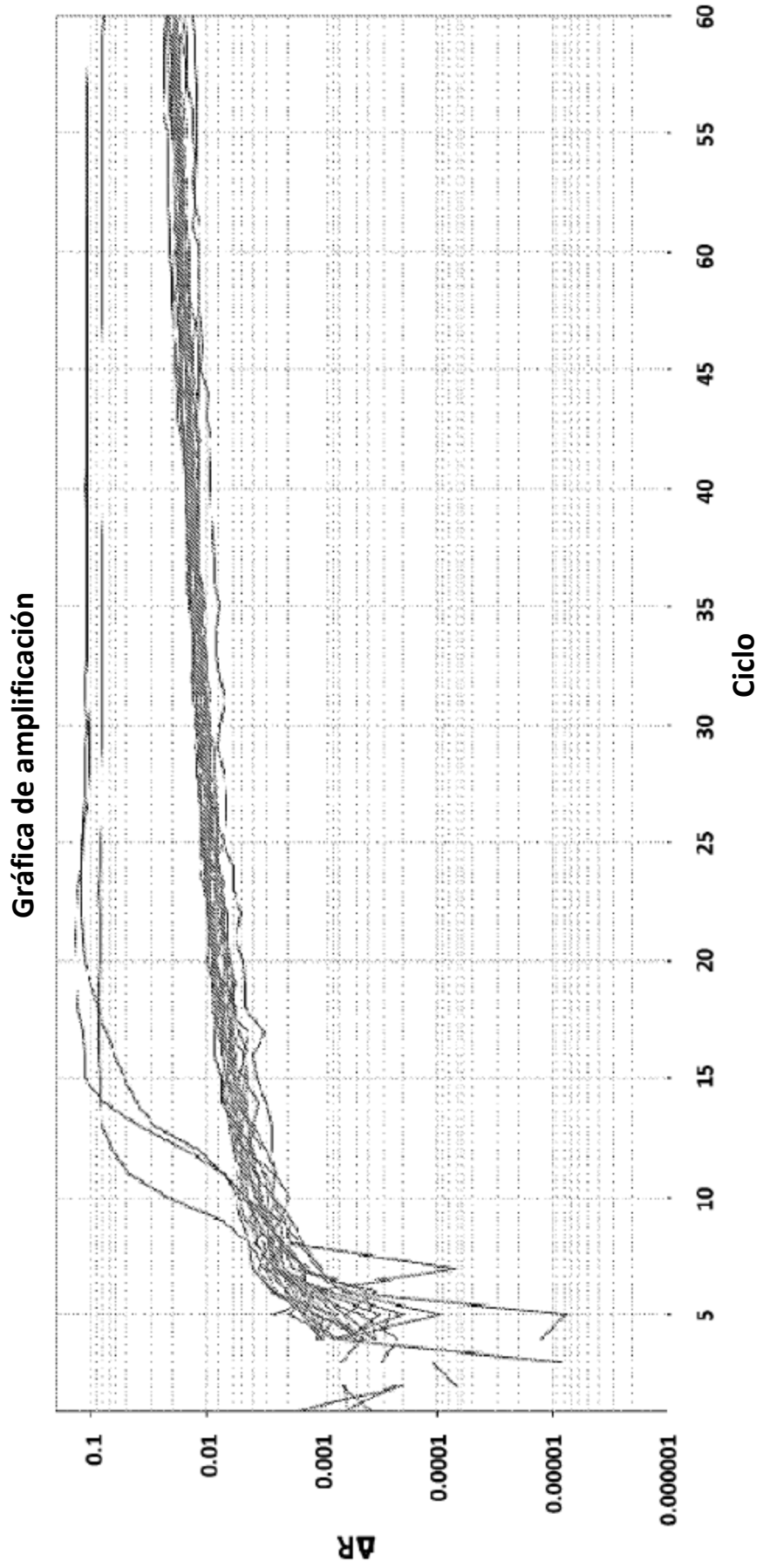


Figura 11B

Gráfica de amplificación

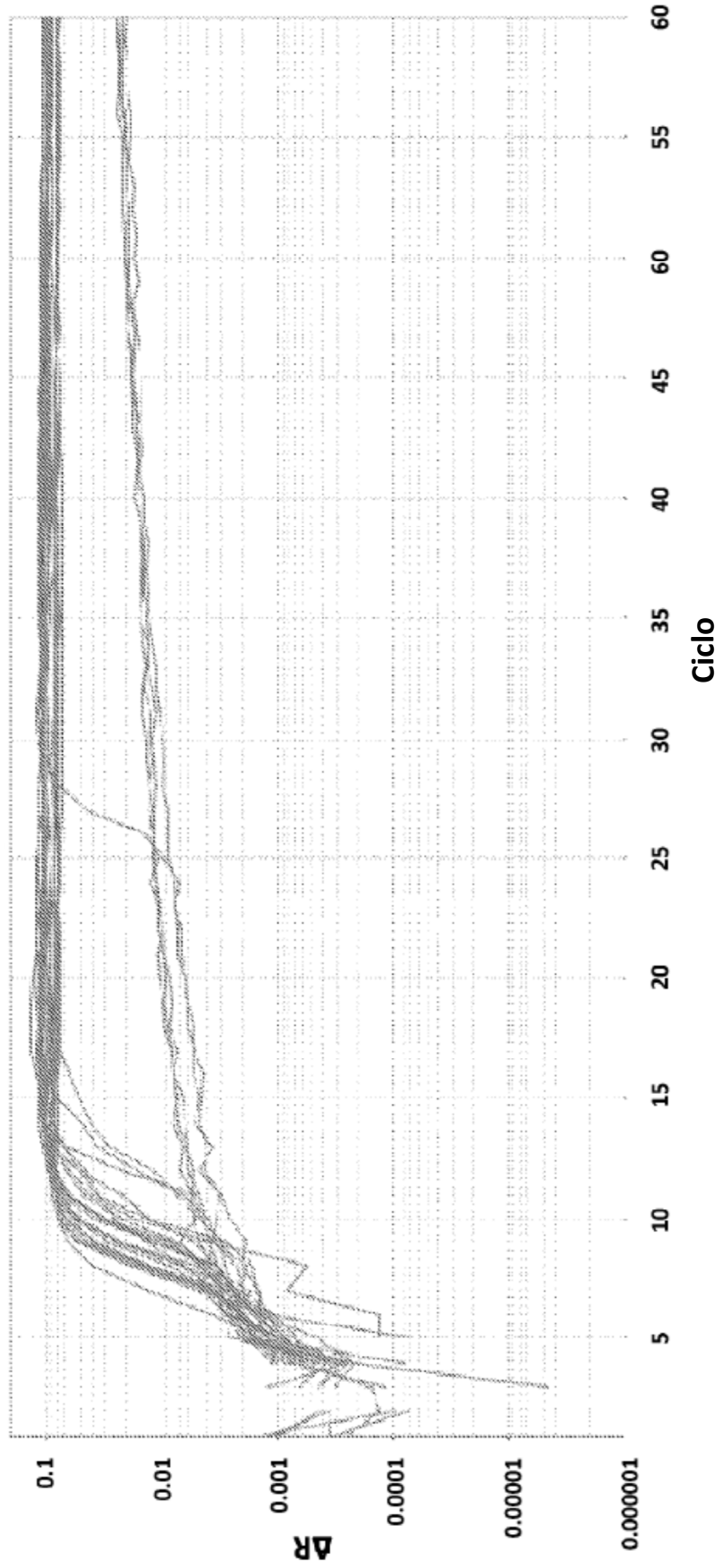


Figura 12A

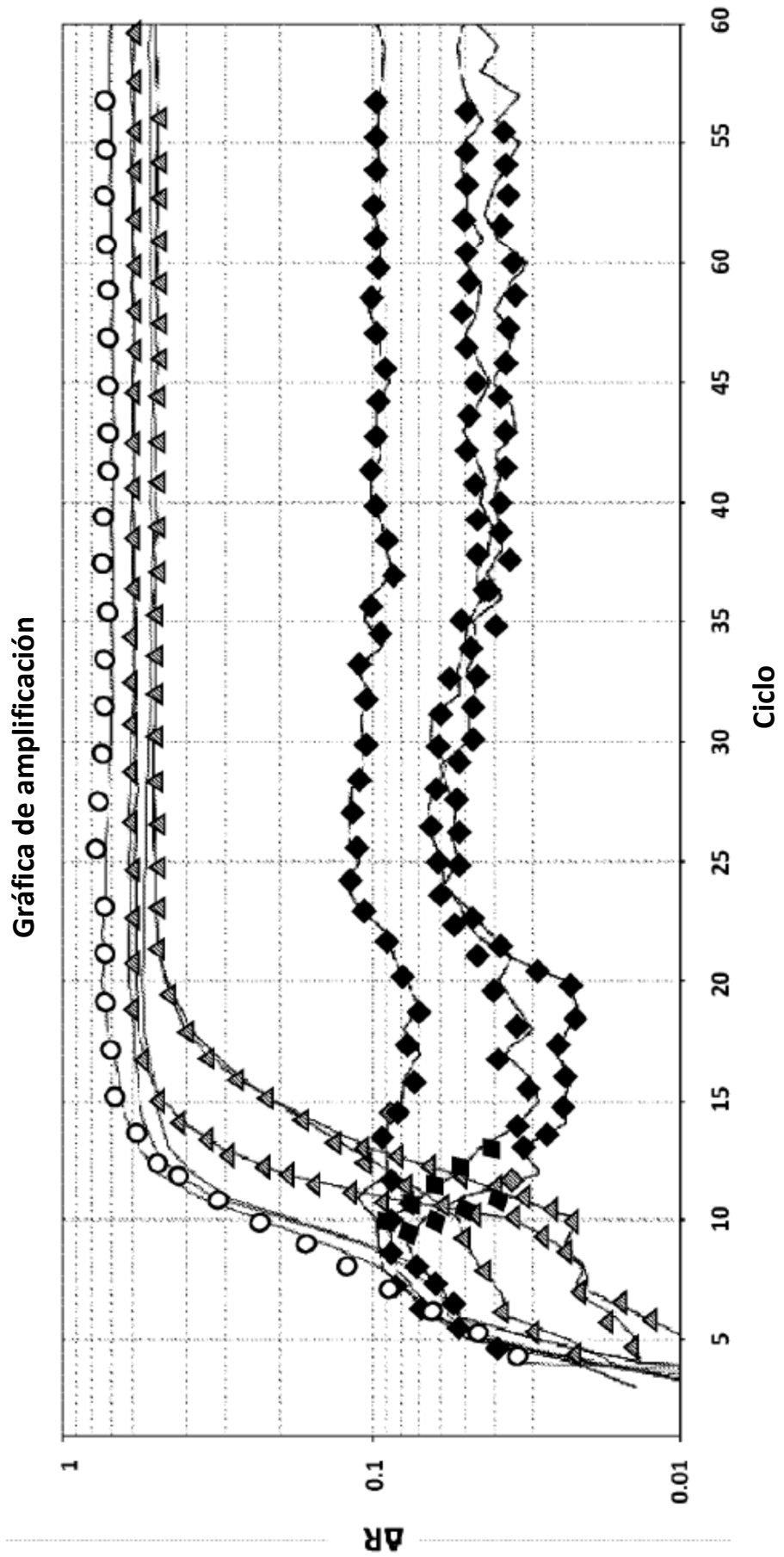
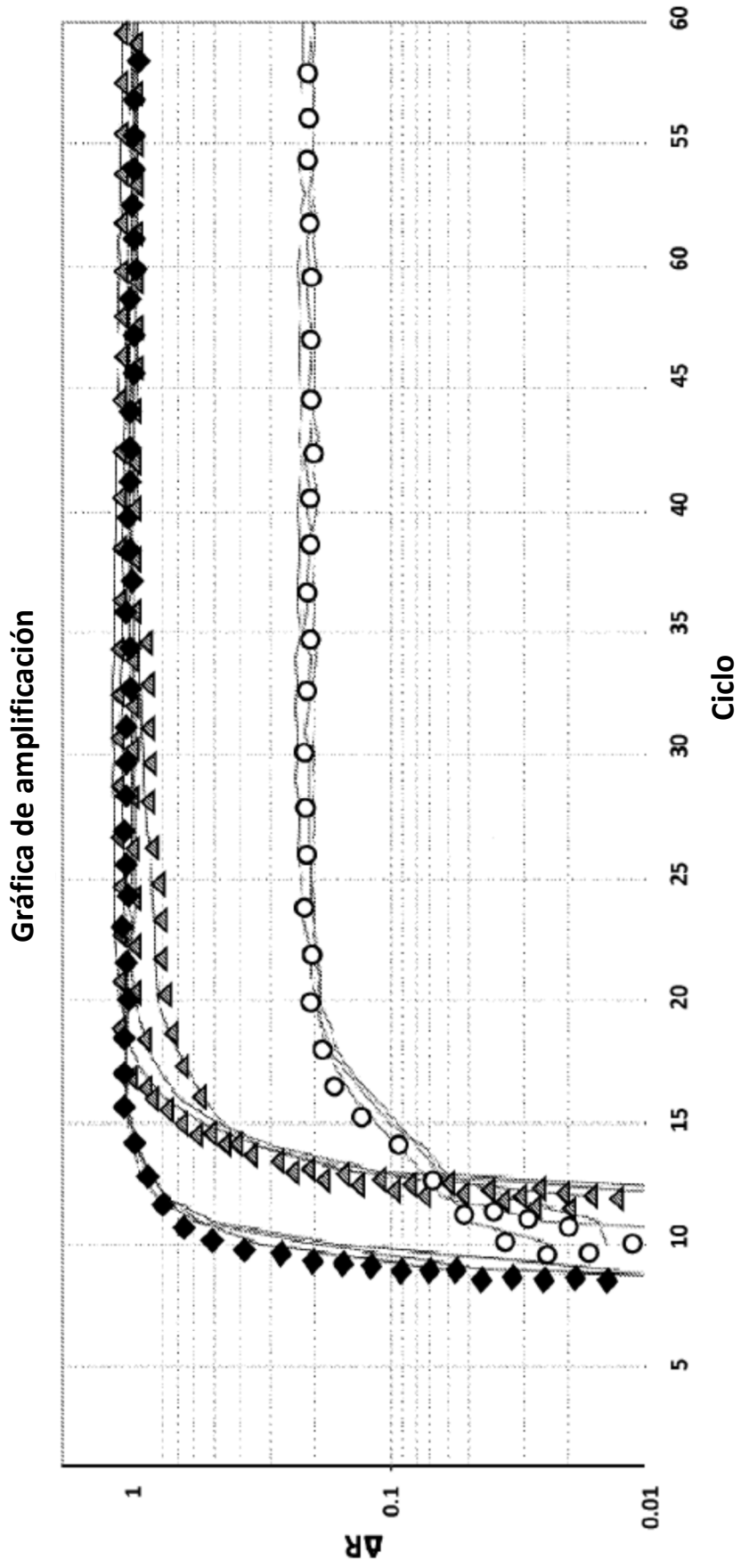


Figura 12B



Cuadro 1
Comparación entre la LAMP con V13 para CT y GC, el ensayo múltiple CT/GC Aptima y el ensayo múltiple CT/GC MAST (PB1-FAM de CT + porA7-Alexa546 de GC)

Ensayo en 136 muestras clínicas

Ensayos comparados	Puntuación de concordancia
LAMP para CT frente a PB1-FAM de CT en el ensayo múltiple	92%
LAMP para GC frente a porA7-Alexa546 de GC en el ensayo múltiple	94%
CT en el ensayo múltiple frente a CT Aptima	83%
GC en el ensayo múltiple frente a GC Aptima	86%