



ФЕДЕРАЛЬНАЯ СЛУЖБА
ПО ИНТЕЛЛЕКТУАЛЬНОЙ СОБСТВЕННОСТИ

(12) **ЗАЯВКА НА ИЗОБРЕТЕНИЕ**

(21)(22) Заявка: 2020128413, 29.01.2019

Приоритет(ы):

(30) Конвенционный приоритет:
29.01.2018 US 62/623,531

(43) Дата публикации заявки: 01.04.2022 Бюл. № 10

(85) Дата начала рассмотрения заявки РСТ на
национальной фазе: 31.08.2020(86) Заявка РСТ:
US 2019/015726 (29.01.2019)(87) Публикация заявки РСТ:
WO 2019/148206 (01.08.2019)

Адрес для переписки:

119019, Гоулинг ВЛГ (Интернэшнл) Инк.,
Гоголевский бульвар, дом 11, Москва,
Российская Федерация, Костюшенкова Мария
Юрьевна

(71) Заявитель(и):

**ЗЕ БРОАД ИНСТИТУТ, ИНК. (US),
МАССАЧУСЕТТС ИНСТИТУТ ОФ
ТЕХНОЛОДЖИ (US),
ПРЕЗИДЕНТ ЭНД ФЕЛЛОВС ОФ
ХАРВАРД КОЛЛЕДЖ (US)**

(72) Автор(ы):

**ЧЖАНГ, Фенг (US),
ГУТЕНБЕРГ, Джонатан (US),
АБУДАЙЙЕХ, Омар (US)**(54) **ДИАГНОСТИКА НА ОСНОВЕ ЭФФЕКТОРНОЙ СИСТЕМЫ CRISPR**

(57) Формула изобретения

1. Система обнаружения нуклеиновой кислоты, включающая:
детектирующую систему CRISPR, содержащую эффекторный белок и одну или более
направляющих РНК, сконструированных с возможностью связывать целевые молекулы;
и

аптамер нуклеиновой кислоты, содержащий квадруплекс, обладающий
ферментативной активностью.

2. Система по п. 1, в которой ферментативная активность представляет собой
пероксидазную активность.

3. Система по п. 1 или 2, дополнительно содержащая реагенты для амплификации
нуклеиновых кислот.

4. Система по п. 1, в которой целевой молекулой является целевая ДНК, и система
дополнительно содержит праймер, который связывает целевую ДНК и содержит
промотор РНК-полимеразы.

5. Система по любому из пп. 1-4, в которой эффекторный белок системы CRISPR
представляет собой РНК-нацеленный эффекторный белок.

6. Система по п. 5, в которой РНК-нацеленный эффекторный белок содержит один
или более доменов HEPN.

7. Система по п. 6, в которой один или более доменов HEPN содержат

аутоиммунное заболевание.

23. Система по п. 20, в которой болезненное состояние представляет собой инфекцию.

24. Система по п. 23, в которой инфекция вызвана вирусом, бактерией, грибом, простейшим организмом или паразитом.

25. Система по п. 24, в которой инфекция является вирусной инфекцией.

26. Система по п. 25, в которой вирусная инфекция вызвана ДНК-вирусом.

27. Система по п. 26, в которой ДНК-вирус представляет собой Myoviridae, Podoviridae, Siphoviridae, Alloherpesviridae, Herpesviridae (включая вирус герпеса человека и вирус ветряной оспы), Malcoherpesviridae, Lipothrixviridae, Rudiviridae, Adenoviridae, Ampullaviridae, Ascoviridae, Asfarviridae (включая вирус африканской чумы свиней), Baculoviridae, Cicaudaviridae, Clavaviridae, Corticoviridae, Fuselloviridae, Globuloviridae, Guttaviridae, Hytrosaviridae, Iridoviridae, Maseilleviridae, Mimiviridae, Nudiviridae, Nimaviridae, Pandoraviridae, Papillomaviridae, Phycodnaviridae, Plasmaviridae, Polydnaviruses, Polyomaviridae (включая вирус обезьян 40, вирус JC, вирус BK), Poxviridae (включая коровью оспу и черную оспу), Sphaerolipoviridae, Tectiviridae, Turriviridae, Dinodnavirus, Salterprovirus или Rhizidovirus.

28. Система по п. 25, в которой вирусная инфекция вызвана вирусом, содержащим двухцепочечную РНК, вирусом, содержащим положительно-полярную РНК, вирусом, содержащим отрицательно-полярную РНК, ретровирусом или их комбинацией.

29. Система по п. 28, в которой вирусная инфекция вызвана коронавирусом, пикорнавирусом, калицивирусом, флавивирусом, тогавирусом, борнавирусом, филовirusом, парамиксовирусом, пневмовирусом, рабдовирусом, аренавирусом, буньявирусом, ортомиксовирусом или дельтавирусом.

30. Система по п. 29, в которой вирусная инфекция вызвана коронавирусом, SARS, полиовирусом, риновирусом, вирусом гепатита А, вирусом Норуолк, вирусом желтой лихорадки, вирусом Западного Нила, вирусом гепатита С, вирусом лихорадки Денге, вирусом Зика, вирусом краснухи, вирусом Росс-ривер, вирусом Синдбис, вирусом Чикунгунья, вирусом болезни Борна, вирусом Эбола, вирусом Марбург, вирусом кори, вирусом свинки, вирусом Нипах, вирусом Хендра, вирусом ньюкаслской болезни, респираторным синцитиальным вирусом человека, вирусом бешенства, вирусом Ласса, хантавирусом, вирусом конго-крымской геморрагической лихорадки, вирусом гриппа или вирусом гепатита D.

31. Система по п. 24, в которой инфекция является бактериальной инфекцией.

32. Система по п. 31, в которой бактерия, вызывающая бактериальную инфекцию, представляет вид Acinetobacter, вид Actinobacillus, вид Actinomycetes, вид Actinomyces, Aerococcus species вид Aeromonas, вид Anaplasma, вид Alcaligenes, вид Bacillus, вид Bacteriodes, вид Bartonella, вид Bifidobacterium, вид Bordetella, вид Borrelia, вид Brucella, вид Burkholderia, вид Campylobacter, вид Capnocytophaga, вид Chlamydia, вид Citrobacter, вид Coxiella, вид Corynbacterium species, вид Clostridium, вид Eikenella, вид Enterobacter, вид Escherichia, вид Enterococcus, вид Ehlichia, вид Epidermophyton, вид Erysipelothrix, вид Eubacterium, вид Francisella, вид Fusobacterium, вид Gardnerella, вид Gemella, вид Haemophilus, вид Helicobacter, вид Kingella, вид Klebsiella, вид Lactobacillus, вид Lactococcus, вид Listeria, вид Leptospira, вид Legionella, вид Leptospira, Leuconostoc, вид Mannheimia, вид Microsporium, вид Micrococcus, вид Moraxella, вид Morganell, вид Mobiluncus, вид Micrococcus, Mycobacterium, вид Mycoplasm, вид Nocardia, вид Neisseria, вид Pasteurella, вид Pediococcus, вид Peptostreptococcus, вид Pityrosporum, вид Plesiomonas, вид Prevotella, вид Porphyromonas, вид Proteus, вид Providencia, вид Pseudomonas, вид Propionibacteriums, вид Rhodococcus, вид Rickettsia, вид Rhodococcus, вид Serratia, вид Stenotrophomonas, вид Salmonella, вид Serratia, вид Shigella, вид Staphylococcus, вид Streptococcus, вид Spirillum, вид Streptobacillus, вид Treponema, вид Tropheryma, вид Trichophyton, вид Ureaplasma, вид

48. Устройство по любому из пп. 45-47, в котором отдельные дискретные объемы представляют собой капли.

49. Устройство по любому из пп. 45-48, в котором отдельные дискретные объемы определены на твердой подложке.

50. Устройство по п. 49, в котором отдельные дискретные объемы представляют собой микролунки.

51. Диагностическое устройство по любому из пп. 45-47, в котором отдельные дискретные объемы представляют собой пятна, определенные на подложке.

52. Устройство по п. 51, в котором подложка представляет собой подложку из гибкого материала.

53. Устройство по п. 52, в котором подложка из гибкого материала представляет собой бумажную подложку или подложку на основе гибкого полимера.

54. Способ обнаружения целевых нуклеиновых кислот в образцах, включающий: распределение образца или набора образцов по одному или более дискретным объемам, причем отдельные дискретные объемы содержат систему CRISPR по любому из пп. 1-44;

инкубацию образца или набора образцов в условиях, достаточных для обеспечения связывания одной или более направляющих РНК с одной или более целевыми молекулами;

активацию эффекторного белка CRISPR посредством связывания одной или более направляющих РНК с одной или более целевыми молекулами, причем активация эффекторного белка CRISPR приводит к модификации содержащего квадруплекс РНК-аптамера таким образом, что ферментативная активность квадруплекса инактивируется; и

обнаружение ферментативной активности, при этом обнаружение ниже порогового значения указывает на присутствие одной или более целевых молекул в образце.

55. Способ по п. 54, в котором целевая молекула представляет собой целевую ДНК, и способ дополнительно включает связывание целевой ДНК с праймером, содержащим сайт РНК-полимеразы.

56. Способ по любому из пп. 54-55, дополнительно включающий амплификацию образца РНК или триггерной РНК.

57. Способ по п. 56, в котором амплификация РНК включает амплификацию с помощью NASBA.

58. Способ по п. 56, в котором амплификация РНК включает амплификацию с помощью RPA.

59. Способ по любому из пп. 54-58, в котором образец представляет собой биологический образец или образец окружающей среды.

60. Способ по п. 59, в котором биологический образец представляет собой кровь, плазму, сыворотку, мочу, кал, мокроту, слизь, лимфатическую жидкость, синовиальную жидкость, желчь, асциты, плевральный выпот, серому, слюну, цереброспинальную жидкость, внутриглазную жидкость или стекловидное тело или любые выделения организма, трансудат, экссудат (например, жидкость, полученную из абсцесса или любого другого участка инфекции или воспаления) или жидкость, полученную из сустава (например, нормального сустава или сустава, пораженного заболеванием, таким как ревматоидный артрит, остеоартрит, подагра или септический артрит), или мазок с поверхности кожи или слизистой оболочки.

61. Способ по п. 59, в котором образец окружающей среды получен из пробы пищи, бумажной поверхности, ткани, металлической поверхности, деревянной поверхности, пластиковой поверхности, пробы почвы, пробы свежей воды, пробы сточной воды, пробы соленой воды, или их комбинации.

62. Способ по любому из пп. 54-61, в котором одна или более направляющих РНК сконструированы для обнаружения однонуклеотидного полиморфизма в целевой РНК или целевой ДНК, или варианта сплайсинга РНК-транскрипта.

63. Способ по любому из пп. 54-62, в котором одна или более направляющих РНК сконструированы для связывания с одной или более целевыми молекулами, которые являются диагностическими в отношении болезненного состояния.

64. Способ по любому из пп. 54-63, в котором одна или более направляющих РНК сконструированы для связывания с внеклеточными нуклеиновыми кислотами.

65. Способ по п. 63, в котором болезненное состояние представляет собой инфекцию, заболевание органа, заболевание крови, заболевание иммунной системы, рак, заболевание головного мозга и нервной системы, эндокринное заболевание, беременность или связанное с рождением ребенка заболевание, наследственное заболевание или приобретенное вследствие влияния окружающей среды заболевание.

66. Способ выявления целевой нуклеиновой кислоты в образце, включающий: приведение в контакт образца с системой обнаружения нуклеиновой кислоты по любому из пп. 1-44; и

подвергание указанного контактирующего образца иммунохроматографическому анализу латерального потока.

67. Способ по п. 54, в котором ферментативная активность квадруплекса приводит к появлению в образце цветового сигнала.

68. Способ по п. 67, в котором деактивация ферментативной активности квадруплекса приводит к потере цветового сигнала, при этом потеря цветового сигнала указывает на присутствие целевой молекулы.