

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 999 908**

51 Int. Cl.:

C12Q 1/682

(2008.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **19.06.2020 PCT/NL2020/050400**

87 Fecha y número de publicación internacional: **24.12.2020 WO20256553**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **19.06.2020 E 20744159 (3)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **06.11.2024 EP 3987058**

54 Título: **Diagnóstico basado en CRISPR/Cas tipo III**

30 Prioridad:

**19.06.2019 EP 19181371
07.04.2020 EP 20168487**

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
27.02.2025

73 Titular/es:

**SCOPE BIOSCIENCES B.V. (100.00%)
Bronland 12B-1
6708 WH Wageningen, NL**

72 Inventor/es:

**STEENS, AIKO JURRE;
PRINSEN, STIJN HENDRIKUS PETRUS;
VAN DER OOST, JOHN y
STAALS, RAYMOND HUBERT JOSÈPHE**

74 Agente/Representante:

SÁEZ MAESO, Ana

Observaciones:

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

ES 2 999 908 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

Diagnóstico basado en CRISPR/Cas tipo III

Campo: La invención descrita en la presente memoria está dirigida a un sistema de detección de ácidos nucleicos relacionado con CRISPR/Cas y su amplio uso en aplicaciones de diagnóstico.

5 1. Introducción

10 Durante la última década, el mundo de la biología molecular ha sido objeto de diversos descubrimientos revolucionarios que han tenido consecuencias que han trascendido mucho más allá de su propio campo. Sin duda, CRISPR/Cas (Repeticiones palindrómicas cortas agrupadas y regularmente interespaciadas, CRISPR/genes asociados) puede considerarse como uno de estos descubrimientos. El sistema CRISPR/Cas fue identificado como un sistema inmune adaptativo procarionte, que proporciona defensa específica de secuencia contra elementos genéticos extraños, como bacteriófagos y plásmidos. Sin embargo, el sistema CRISPR/Cas permite perturbaciones genéticas en la mayoría de los organismos, si no en todos, lo que tendrá enormes consecuencias en todos los campos de la tecnología.

15 La defensa de CRISPR se puede describir como un proceso que consta de tres etapas: adaptación, expresión e interferencia (Rath et al., 2015. *Biochimie* 117: 119-128; Makarova et al., 2011. *Nat Rev Microbiol* 9: 467-477). Durante la etapa de adaptación, se adquieren fragmentos génicos de entidades invasoras extrañas y se almacenan en la memoria de CRISPR (Jackson et al., 2017. *Science* 356: eaal5056). Esta memoria comprende las secuencias de ADN extrañas, llamadas espaciadoras, las cuales están separadas por secuencias de ADN repetitivas (repeticiones). La expresión del locus de CRISPR (etapa II) conduce a la transcripción de una molécula de ARN larga, la cual posteriormente se procesa en múltiples ARNs de CRISPR (ARNcr) (Brouns et al., 2008. *Science* 321: 960-964). Adicionalmente, la célula expresa proteínas Cas, los efectores del sistema CRISPR/Cas, los cuales forman complejos de ribonucleoproteína (RNP) mediante la incorporación de los ARNcr. Una vez que se detecta un elemento génico extraño debido a la complementariedad de la secuencia con un ARNcr, la proteína Cas asociada utilizará su actividad de nucleasa para degradar la entidad invasora, a menudo descrita como la etapa de interferencia del proceso de defensa de CRISPR.

20 Debido a la gran cantidad de investigación dedicada a CRISPR/Cas durante la última década, se ha descubierto una gran cantidad de sistemas dentro de los reinos de las bacterias y las arqueas (Fenner et al., 2007. *J Biomol Screen* 20: 1027-1039; van der Oost et al., 2009. *Trends Biochem Sciences* 34: 401-407). Se ha realizado una categorización de los sistemas CRISPR/Cas. Los sistemas de clase I utilizan complejos Cas de múltiples subunidades, mientras que los sistemas de clase II utilizan solamente una única proteína Cas para mediar su actividad. Los diferentes tipos se caracterizan generalmente basándose en la presencia de firmas génicas (Wright et al., 2016. *Cell* 164: 29-44).

25 En contraste con las diferencias que hacen posible distinguir los numerosos sistemas CRISPR/Cas, la gran mayoría comparten similitudes funcionales. Casi todos los tipos de CRISPR/Cas funcionan como dianas de ADN dirigidas a RNPs, lo cual probablemente esté relacionado con la gran cantidad de entidades invasoras basadas en ADN. Por el contrario, los elementos invasores de naturaleza basada en ARN no se encuentran a menudo en el mundo procarionte. Por lo tanto, es un tanto sorprendente que los sistemas CRISPR/Cas Tipo III hayan evolucionado para dirigirse a secuencias de ARN (Wright et al., 2016. *Cell* 164: 29-44; Hale et al., 2009. *Cell* 139: 945-956). La investigación ha atribuido esta actividad aberrante a la degradación de las transcripciones que se originan a partir de bacteriófagos invasores, lo que les impide entonces lisar a la célula (Jiang et al., 2016. *Cell* 164: 710-721; Goldberg et al., 2014. *Nature* 514: 633-637). El sistema Tipo III pertenece a la clase I, lo que significa que las RNPs consisten en múltiples subunidades.

30 Con tres tipos diferentes de actividad de nucleasa, el sistema Tipo III se puede considerar único. Rouillon et al. (Rouillon et al., 2018. *eLIFE* 7: e36734) describen un sistema efector mediado por Cas Tipo IIID de *S. solfataricus*. Niewoehner et al. (Niewoehner et al., 2017. *Nature* 548: 543-548) describen un sistema efector Cas Tipo IIIA de *Staphylococcus epidermidis*. Han et al. (Han et al., 2018. *Nucleic Acids Research* 46: 10319-10330) describe un complejo efector Cmr Tipo IIIB. Adicionalmente, la producción de la molécula mensajera oligoadenilato cíclico (cOA) no se ha atribuido a ningún otro sistema CRISPR/Cas. La explotación de estas características podría conducir a nuevas formas de visualizar el reconocimiento de dianas, lo cual hace que el sistema Tipo III sea adecuado para la aplicación en nuevas herramientas de diagnóstico.

35 2. Descripción breve de la invención

40 La invención proporciona un sistema de detección de ácido ribonucleico basado en repeticiones palindrómicas cortas agrupadas y regularmente interespaciadas (CRISPR) que comprende a) un complejo efector que comprende una proteína efectora asociada a CRISPR Tipo III (Cas) y al menos un ARN de CRISPR (ARNcr) que se une a una molécula de ácido nucleico diana, y b) medios para determinar directa o indirectamente un nivel de oligoadenilato cíclico (cOA), en el que dicha Cas Tipo III es una Cas 7 Tipo III que carece de la actividad de escisión. Dicho sistema de detección es preferiblemente una Cas Tipo IIIB, preferiblemente una Cmr Tipo IIIB. Dicha Cas Tipo III es preferiblemente de un organismo termófilo tal como *Thermus thermophilus*.

Dicha Cas Tipo III carece de la actividad de escisión, por ejemplo, mediante una mutación D26N de una subunidad de Cmr4, o una mutación equivalente en otra subunidad. Otras mutaciones preferibles de escisión muerta incluyen D26A de Cmr4, un doble mutante E227A y E228 de Cmr4, y D86A de Cmr4 (Ramia et al., 2014. Cell Reports 9: 1610-1617; Zhu and Ye, 2015. Nucleic Acids Res 43: 1257-1267). Además, un D32A de Csm3 es un buen candidato para un mutante Csm Tipo IIIA de escisión muerta (Samai et al., 2015. Cell 161: 1164-1174).

En un sistema de detección preferible de acuerdo con la invención, dichos medios para determinar directa o indirectamente un nivel de cOA comprenden medios para determinar un nivel de pirofosfato (PPi). Un sistema de detección preferible de acuerdo con la invención puede comprender adicionalmente una pirofosfatasa inorgánica. Dicha pirofosfatasa inorgánica es preferiblemente de un organismo termófilo tal como *Thermus thermophilus*, haciéndola compatible con el sistema CRISPR/Cas Tipo III preferible y permite la detección isotérmica.

Un sistema de detección preferible de acuerdo con la invención comprende adicionalmente una endorribonucleasa efectora no específica dependiente de cOA tal como Csx1

Un sistema de detección preferible de acuerdo con la invención comprende adicionalmente una endorribonucleasa efectora no específica dependiente de cOA tal como Csx1, y un sustrato detectable para dicha endorribonucleasa.

La invención proporciona adicionalmente un método para determinar la presencia o ausencia de una molécula de ácido nucleico diana en una muestra, que comprende proporcionar la muestra con un sistema de detección de ácido ribonucleico de acuerdo con la invención, incubar la muestra bajo condiciones que permitan la unión del ARNcr a su molécula de ácido nucleico diana, y determinar directa o indirectamente un nivel de oligoadenilato cíclico (cOA), por lo que un aumento en el nivel de cOA determinado, en comparación con un control, es indicativo de la presencia de dicha molécula diana en dicha muestra.

Un nivel de cOA puede determinarse mediante la determinación de un nivel de pirofosfato, o un nivel de fosfato inorgánico en caso de que una pirofosfatasa inorgánica esté presente en el sistema de detección. Un nivel de pirofosfato o fosfato inorgánico se determina preferiblemente mediante un ensayo basado en colorimetría, fluorimetría, fluorescencia o bioluminiscencia.

Un nivel de cOA puede determinarse indirectamente mediante la determinación de un nivel de una endorribonucleasa efectora no específica dependiente de cOA, tal como Csx1, mediante la detección de un sustrato detectable para dicha endorribonucleasa efectora.

Un método preferible de acuerdo con la invención comprende incubar la muestra con el sistema de detección de ácido ribonucleico a una temperatura entre 37 °C y 85 °C, preferiblemente a alrededor de 65 °C.

La invención proporciona adicionalmente un dispositivo que comprende el sistema de detección de ácido ribonucleico de acuerdo con la invención. Dicho dispositivo comprende preferiblemente sistemas de detección de ácido ribonucleico en arreglo múltiple de acuerdo con la invención.

Dichos sistemas de detección de ácido ribonucleico en arreglo múltiple tienen preferiblemente diferentes moléculas de ácido nucleico diana.

3. Leyendas de las figuras

Figura 1. Proteínas Cas Cmr optimizadas por codones utilizando la herramienta de optimización de codones IDT (disponible en eu.idtdna.com/codonopt).

Figura 2. Alineamiento de las secuencias Cmr y Csm.

Figura 3. Ensayos de actividad de ARNasa in vitro con los complejos TtCmr endógenos y reconstituidos. (A) Análisis de electroforesis en gel de poliacrilamida desnaturalizante (PAGE) del ensayo de actividad utilizando un ARN diana etiquetado con 5'-fósforo-32 complementario al ARNcr incubado con el complejo TtCmr endógeno. Se utilizó un marcador de ARN de cadena sencilla ("M") como estándar de tamaño, según se indica a la izquierda. (B) Ensayos de actividad similares al panel A, pero utilizando los complejos reconstituidos.

Figura 4. (A) La actividad de ARNasa de TtCmr no se ve afectada por dianas sin coincidencias en los primeros nucleótidos guía del ARNcr. (B) La producción de cOA se ve afectada significativamente por la falta de coincidencias en las posiciones de nucleótidos 1, 2 y 5.

Figura 5. Ensayo de producción de cOA con A) TtCmr40 y B) TtCmr46, incubados con ARNs diana (Tabla 4) sin coincidencias en las posiciones de nucleótidos indicadas.

Figura 6. Una región semilla flexible en el extremo 3' del ARNcr. Ensayo de degradación del ARN diana y producción de cOA con (A) TtCmr endógeno ("TtCmr") o el complejo TtCmr reconstituido con (B) ARNcr de 46

nucleótidos (nt) ("TtCmr-46") o (C) ARNcr de 40 nt ("TtCmr-40") incubados con ARNs diana (Tabla 4) sin coincidencias en los segmentos indicados.

5 Figura 7. El apareamiento de bases del ARN diana con el ARNcr unido a TtCmr se inicia en el extremo 3' del ARNcr. (A) Análisis del ensayo de desplazamiento de la movilidad electroforética (EMSA) del complejo TtCmr endógeno incubado con diferentes ARNs diana (Tabla 4) cada uno de los cuales contiene un tramo de 5 nt no coincidentes con el ARNcr unido a TtCmr. (B) Análisis de EMSA del complejo TtCmr endógeno incubado con ARNs diana cortos de 11 nt (Tabla 4) complementarios a los nucleótidos indicados de los ARNcr unidos a TtCmr.

10 Figura 8. A) La absorbancia del resultado colorimétrico de la detección de Pi se determinó para un intervalo de concentraciones de ARN diana agregadas por Cmr según se indica. El tiempo de reacción se estableció en 1 hora, el tiempo del desarrollo del color en 30 minutos (detección directa de cOA utilizando el ensayo de verde de malaquita). B) Absorbancia del resultado colorimétrico de la detección del ARN diana mediante la determinación de un nivel de Pi a lo largo del tiempo en aumento de veces (detección directa de cOA utilizando el ensayo de verde de malaquita). C) Detección de la actividad de la ARNasa mediada por cOA de Csx1 utilizando secuencias de ARNs y ADNcs extintoras de fluoróforo (detección indirecta de cOA).

15 Figura 9. Intervalo de sensibilidad del sistema Cmr Tipo IIIB de *T. thermophilus* para el ARN diana nativo 4.5. El reconocimiento de la diana se monitoreó utilizando el método de visualización indirecta de cOA. Se utilizó un ARN aleatorio de longitud similar como control negativo fuera de la diana.

20 Figura 10. Intervalo de sensibilidad del sistema Cmr Tipo IIIB de *T. thermophilus* que contiene el mutante D26N de Cmr4 para el ARN diana nativo 4.5. El reconocimiento de la diana se monitoreó utilizando el método de visualización indirecta de cOA. Se utilizó un ARN aleatorio de longitud similar como control negativo fuera de la diana.

25 Figura 11. Comparación entre el límite de detección del ARN diana de norovirus para el complejo Cmr de tipo silvestre y el complejo dCmr. El reconocimiento de la diana se monitoreó utilizando el método de visualización indirecta de cOA. Se presenta el resultado de señal cruda de este ensayo. Se utilizó un ARN aleatorio de longitud similar como control negativo fuera de la diana.

Figura 12. Producción de cOA por el complejo CRISPR/Cas Tipo IIIA después de la adición de ARN diana complementario.

Figura 13. Resultados del ensayo de detección del gen N de SARS-CoV-19 en un recipiente. La gráfica muestra los datos de la "incubación de producción de señal" a 65 °C.

30 Figura 14. Resultados del ensayo de detección del gen N de SARS-CoV-19 en un recipiente en muestras de visón. La gráfica muestra los datos de la "incubación de producción de señal" a 65 °C

4. Descripción detallada de la invención

4.1 Definiciones

35 El término "Repeticiones palindrómicas cortas agrupadas y regularmente interespaciadas (CRISPR)", como se utiliza en la presente memoria, se refiere a una o más regiones especializadas de ADN en el genoma de microorganismos procariontes. Estas regiones se caracterizan por la presencia de repeticiones de nucleótidos que están intercaladas por secuencias espaciadoras, normalmente repeticiones directas de ADN de entre ~25 y ~38 pb, separadas por secuencias espaciadoras únicas de longitud similar (Grissa et al., 2007), las cuales se derivan de encuentros previos con elementos invasores. Sirven como memoria para atacar rápidamente a estos invasores en una próxima infección. La región genómica incluye uno o más genes que codifican para la proteína efectora asociada a CRISPR (Cas) que se encuentran cercanas a los loci de CRISPR.

40 El término "ARNcr de CRISPR", tal como se utiliza en la presente memoria, se refiere a una molécula de ARN derivada de CRISPR que comprende una secuencia espaciadora y 5 y 3 extremos derivados de repeticiones. Dicho ARNcr de CRISPR tiene preferiblemente una longitud de al menos 30 nucleótidos, más preferiblemente al menos 34 nucleótidos, más preferiblemente al menos 40 nucleótidos, más preferiblemente al menos 46 nucleótidos. Dicho ARNcr de CRISPR tiene preferiblemente menos de 1000 nucleótidos, preferiblemente menos de 200 nucleótidos, preferiblemente menos de 100 nucleótidos. Dicha molécula de ARN puede incluir análogos de nucleótidos de ácido ribonucleico tales como inosina, uridina, xantina, hipoxantina, ribonucleótidos y desoxirribonucleótidos basados en 2,6-diaminopurina y 6,8-diaminopurina.

50 El término "proteína efectora asociada a CRISPR (Cas)", como se utiliza en la presente memoria, se refiere a una proteína que está asociada con el ARNcr de CRISPR. Los sistemas CRISPR/Cas se agrupan actualmente en dos clases. Los sistemas de Clase I utilizan complejos de Cas multisubunidades, mientras que los sistemas de Clase II utilizan solamente una proteína Cas única para mediar su actividad. Los sistemas CRISPR-Cas Tipo III, de Clase I han evolucionado para dirigirse especialmente a secuencias de ARN. Las proteínas únicas

en estos sistemas son Cas3 en los sistemas de Clase I, Cas9 en los sistemas de Clase II y Cas10 en los sistemas de Clase I, Tipo III.

5 El término "complejo efector", como se utiliza en la presente memoria, se refiere a un complejo de ribonucleoproteína de CRISPR-Cas que tiene actividad de nucleasa y puede escindir e inactivar una secuencia de ácido nucleico invasor que comprende secuencias complementarias a la secuencia espaciadora en el ARNcr de CRISPR.

El término "oligoadenilato cíclico (cOA)", como se utiliza en la presente memoria, se refiere a una estructura de anillo que comprende de 3-6 moléculas de Adenosín Monofosfato (AMP). La formación de cOA es catalizada por el dominio ciclasa de Cas10, el cual forma parte de los sistemas efectores Tipo III.

10 El término "Cas Tipo III", como se utiliza en la presente memoria, se refiere a un complejo CRISPR-Cas de múltiples subunidades dirigido al ARN que comprende al menos una proteína Cas10.

15 El término "Cas Tipo IIIA", como se utiliza en la presente memoria, se refiere a un complejo CRISPR/Cas Tipo 3 dirigido al ARN que tiene actividad de ADNasa inespecífica al unirse a una molécula de ARN diana. Las Cas Tipo IIIA incluyen, por ejemplo, complejos Csm Tipo IIIA de *Staphylococcus thermophilus*, *Thermus thermophilus* y *Staphylococcus epidermis*.

El término "Cas Tipo IIIB", como se utiliza en la presente memoria, se refiere a un complejo CRISPR-Cas Tipo 3 dirigido al ARN que carece de la actividad de ADNasa inespecífica. Dicho complejo Cas Tipo IIIB está compuesto de seis a siete proteínas. Cas Tipo IIIB incluyen, por ejemplo, complejos Cmr Tipo IIIB de *Pyrococcus furiosus*, *Thermus thermophilus* y *Sulfolobus solfataricus*.

20 El término "PPi" o fosfonato de fosfato, como se utiliza en la presente memoria, se refiere a una sal o éster de ácido pirofosfórico. Los nombres alternativos son pirofosfato, difosfato y dipolifosfato.

El término "pirofosfatasa inorgánica", o difosfatasa inorgánica, como se utiliza en la presente memoria, se refiere a una enzima que cataliza la conversión de un ion de pirofosfato en dos iones de fosfato. La enzima es de la clase de enzimas EC 3.6.1.1.

25 El término "endoribonucleasa efectora no específica dependiente de cOA", tal como se utiliza en la presente memoria, se refiere a ribonucleasas, las cuales degradan el ARN de forma no específica utilizando un sitio activo HEPN (unión de nucleótidos, eucariotas superiores y procariontes). Estas nucleasas se activan mediante la unión de un mensajero de cOA utilizando su dominio de plegamiento de Rossmann asociado a CRISPR (CARF). Ejemplos de dichas endoribonucleasas efectoras no específicas son las proteínas accesorias de Cas Csx1 y Csm6.

35 El término "biosensor", o "sensor biológico", como se utiliza en la presente memoria, se refiere a un dispositivo sensor que comprende un sistema de ácido ribonucleico basado en CRISPR de acuerdo con la invención. Una señal que se genera cuando el sistema de ácido ribonucleico basado en CRISPR interactúa con una molécula de ARN que es complementaria al ARNcr, por ejemplo, una señal colorimétrica, fluorométrica, fluorescente o bioluminiscente, puede estar acoplada a un transductor, lo que permite la cuantificación de la señal. La señal se convierte preferiblemente por medio de un transductor adecuado en un parámetro eléctrico medible, tal como una corriente o voltaje.

4.2 Sistema de detección de ácido ribonucleico basado en CRISPR/Cas

40 En un aspecto, la invención proporciona un sistema de detección de ácido ribonucleico (ARN) basado en repeticiones palindrómicas cortas agrupadas y regularmente interespaciadas (CRISPR). Dicho sistema comprende un complejo efector que comprende una proteína efectora asociada a CRISPR Tipo III (Cas) y al menos un ARN de CRISPR (ARNcr) que se une a una molécula de ácido nucleico diana y métodos y medios para determinar directa o indirectamente un nivel de oligoadenilato cíclico (cOA), en el que dicha Cas Tipo III es una Cas 7 Tipo III que carece de la actividad de escisión.

45 Dicho sistema de detección de ácido ribonucleico basado en CRISPR/Cas se deriva preferiblemente de un organismo termófilo tal como *Pyrococcus furiosus*, *Sulfolobus solfataricus* o *Thermus thermophilus*. Una ventaja de un sistema de detección de ácido ribonucleico basado en CRISPR/Cas de un organismo termófilo es que la detección se puede realizar a una temperatura elevada, por ejemplo, entre 40 °C y 80 °C, preferiblemente entre 50 °C y 70 °C, tal como entre 55 °C y 65 °C, preferiblemente alrededor de 65 °C. La incubación a esta temperatura puede acelerar la reacción de síntesis de cOA, en comparación con la incubación a una temperatura más baja. Además, dicha temperatura elevada puede inactivar una nucleasa, tal como una ADNasa o ARNasa, o proteasa que esté presente en la muestra.

50 Además, una ventaja de un sistema de detección de ácido ribonucleico basado en CRISPR/Cas de un organismo termófilo puede proporcionar una mayor estabilidad al sistema, tal como que puede almacenarse

durante un período de tiempo más largo, cuando se compara con un sistema de detección de ácido ribonucleico basado en CRISPR/Cas de un organismo mesófilo.

Dicho sistema de detección de ácido ribonucleico se basa en el sistema CRISPR/Cas procarionte que constituye un sistema de inmunidad adquirida para proteger a las células procariontes contra virus y plásmidos invasores, análogo al sistema de interferencia de ARN (ARNi) eucarionte (Makarova et al., 2006. Biol Direct 1: 1-7). Una respuesta inmune de CRISPR-Cas consta de tres etapas distintas: 1) Adaptación, por la cual una parte del ADN diana de un invasor se escinde y se inserta en un arreglo de CRISPR; 2) Expresión y maduración del ARN de CRISPR (cr) y asociación de un complejo de CRISPR/Cas; y 3) Interferencia cuando el ARNcr se utiliza como guía para reconocer secuencias complementarias a la secuencia CRISPR madura en un genoma invasor de un virus o plásmido, seguido de la escisión e inactivación del ácido nucleico extraño por una nucleasa Cas.

Una estructura general de los complejos CRISPR/Cas Tipo III es que comprenden múltiples subunidades de Cas7 y Cas11 (Staals et al., 2013. Mol. Cell 52: 135-145; Staals et al., 2014. Mol. Cell 56: 518-530), las cuales están rematadas en un lado por Cas5 y Cas10. De estas, Cas7 proporciona actividad de ARNasa tras el reconocimiento del ARN diana por la guía de ARN precargada.

Se ha demostrado que el reconocimiento de dianas promueve la producción de oligoadenilatos cíclicos (cOA) mediante el dominio Palm de Cas10 (Kazlauskiene et al., 2017. Science 357: 605-609; Niewoehner et al., 2017. Nature 548: 543-548). Aunque las especies de cOA son moléculas de señalización conocidas en eucariontes, no se había reportado antes dicha actividad en hospederos procariontes. Sin embargo, la investigación indica que la presencia de cOA conduce a un gran aumento de la actividad de la ARNasa por parte de los miembros de la familia Csm6 o Csx1. Estas proteínas a menudo se codifican en los loci Tipo III, pero no se asocian directamente con el complejo de ribonucleoproteína. En cambio, el reconocimiento de las transcripciones de ARN invasor puede dar como resultado la degradación dirigida del ARN mediante Cas7, la degradación no específica del ADN por una Cas10 de Clase I, tipo IIIA, así como la producción de cOA que conduce a la activación de Csm6 o Csx1, lo que provoca la escisión colateral de otras moléculas de ARN de cadena sencilla cercanas.

Los métodos para determinar directamente un nivel de cOA incluyen preferiblemente métodos para determinar un nivel de pirofosfato o PPi. La formación de pirofosfato está acoplada a la formación de cOA a partir de ATP por una proteína asociada a CRISPR/Cas tal como Cas10. La formación de cOA, que consta de 3-6 unidades de AMP, da como resultado la formación simultánea de 3-6 moléculas de PPi.

Como una alternativa, el sistema de detección de acuerdo con la invención puede comprender una pirofosfatasa inorgánica, lo que da como resultado la descomposición de PPi y la formación de dos moléculas de fosfato inorgánico por cada molécula de PPi. Por lo tanto, al determinar un nivel de fosfato inorgánico, el número de moléculas detectables se amplifica de 1 molécula de cOA a 6-12 moléculas de Pi.

Una pirofosfatasa inorgánica preferible es una enzima que es activa a la misma temperatura o a una similar a la del sistema de detección de ARN basado en CRISPR/Cas Tipo III. Además, es preferible que la pirofosfatasa inorgánica sea activa bajo las mismas condiciones o similares a las del sistema de detección de ARN basado en CRISPR/Cas Tipo III, incluyendo al mismo pH o uno similar y en las mismas concentraciones de sal o similares. Por ejemplo, si el sistema de detección de ARN basado en CRISPR/Cas Tipo III tiene una actividad óptima a 50 °C, es preferible que la pirofosfatasa inorgánica sea activa a esta temperatura. Preferiblemente, la actividad de la pirofosfatasa inorgánica a 50 °C es tal que esencialmente todas las moléculas de PPi se descomponen en moléculas de fosfato inorgánico. Dicha descomposición es preferiblemente instantánea. De manera similar, la actividad de la pirofosfatasa inorgánica al pH y las concentraciones de sal elegidos es tal que esencialmente todas las moléculas de PPi se descomponen en moléculas de fosfato inorgánico. Dicha descomposición es preferiblemente instantánea.

Una pirofosfatasa inorgánica preferible es la de un organismo termófilo tal como *Pyrococcus furiosus*, *Sulfolobus solfataricus* y *Thermus thermophilus*, lo que permite una detección isotérmica simultánea. De esta manera, se puede determinar directamente un nivel de cOA mediante la determinación de un nivel de Pi.

PPi y Pi se pueden detectar utilizando métodos conocidos en la técnica, incluyendo ensayos basados en colorimetría, fluorimetría, fluorescencia o bioluminiscencia.

Los métodos adecuados para determinar un nivel de PPi incluyen un Kit de Ensayo de pirofosfato (PPi) fluorométrico y/o colorimétrico (Biovision Inc., Milpitas, CA); un Kit de Detección de Pirofosfato fluorescente EnzChek® (ThermoFisher Scientific; Waltham, MA); un Kit de Ensayo de Pirofosfato fluorométrico (SigmaAldrich, Saint Louis, MO); y un ensayo luminiscente PPILight™ (Lonza Group A.G., Basel, Switzerland).

Los métodos adecuados para determinar un nivel de fosfato inorgánico o Pi incluyen un ensayo colorimétrico PiColorLock™ (Expdeon, Cambridge, UK); un Kit de Ensayo colorimétrico de Fosfato Verde de Malaquita (SigmaAldrich, Saint Louis, MO); un Sensor de Fosfato fluorescente (ThermoFisher Scientific; Waltham, MA); una lectura luminiscente después de la conversión de ADP a ATP (solicitud de patente de US

US20140273036A); un quimiosensor fluorescente (Meng et al., 2015. RSC Advances 5: 53189-53197); y puntos cuánticos de grafeno fotoluminiscentes combinados con iones de Europio (Bai et al., 2013. Chemistry 19: 3822-3826).

5 Los métodos y medios para determinar directamente un nivel de oligoadenilato cíclico (cOA) incluyen preferiblemente al menos un sustrato y, si se requiere, una enzima que permite al menos uno de los métodos de detección indicados para PPI o Pi.

Un método preferible es un método colorimétrico tal como el Kit de Ensayo de Fosfato Verde de Malaquita, que permite la determinación rápida de un nivel de PPI o Pi, como una determinación directa de un nivel de cOA.

10 Los métodos para determinar indirectamente un nivel de cOA incluyen preferiblemente métodos para determinar una actividad de una nucleasa efectora no específica dependiente de cOA, como la nucleasa auxiliar 1 de CRISPR (Can1) o Can2 y, preferiblemente, métodos para determinar una actividad de una endorribonucleasa efectora no específica dependiente de cOA, tal como Csx1. Para ello, un sistema de detección de acuerdo con cualquier invención incluye preferiblemente una endorribonucleasa efectora no específica dependiente de cOA, tal como Csx1.

15 Dicha nucleasa efectora no específica dependiente de cOA, preferiblemente una endorribonucleasa, es preferiblemente una enzima que es activa a la misma temperatura o a una similar a la del sistema de detección de ARN basado en CRISPR/Cas Tipo III. Además, es preferible que la endorribonucleasa efectora no específica dependiente de cOA sea activa bajo las mismas condiciones o similares a las del sistema de detección de ARN
20 basado en CRISPR/Cas Tipo III, incluyendo al mismo pH o uno similar y a las mismas concentraciones de sal o similares. Por ejemplo, si el sistema de detección de ARN basado en CRISPR/Cas Tipo III tiene una actividad óptima a 65 °C, es preferible que la endorribonucleasa efectora no específica dependiente de cOA esté activa a esta temperatura.

25 Preferiblemente, la actividad de la endorribonucleasa efectora no específica dependiente de cOA a 65 °C es tal que la actividad inducida por cOA de la endorribonucleasa efectora no específica dependiente de cOA da como resultado la producción de cantidades detectables de un producto de reacción del sustrato de dicha endorribonucleasa efectora no específica dependiente de cOA. De manera similar, la actividad de la endorribonucleasa efectora no específica dependiente de cOA al pH y las concentraciones de sal elegidas es tal que la actividad inducida por cOA de la endorribonucleasa efectora no específica dependiente de cOA da como resultado la producción de cantidades detectables de un producto de reacción del sustrato de dicha
30 endorribonucleasa efectora no específica dependiente de cOA.

35 Un sustrato para la endorribonucleasa efectora no específica dependiente de cOA es preferiblemente una molécula de ARN, cuya escisión se puede detectar. La detección se puede realizar mediante cualquier método conocido en la técnica. Por ejemplo, la detección se puede realizar directamente mediante espectrometría de masas, por ejemplo, cromatografía líquida de ultra alta resolución (UHPLC) acoplada a espectrometría de masas en tándem (LC-MS/MS) en modo de ionización por electropulverización positiva. El análisis de LC-MS/MS se puede realizar, por ejemplo, utilizando un sistema cromatográfico UHPLC de alta gama acoplado a un espectrómetro de masas de triple cuadrupolo.

La detección se puede realizar adicionalmente mediante la separación de fases líquido-líquido (LLPS; Spoelstra et al., 2018. BioRxiv, CSHL (doi.org/10.1101/471482).

40 Un sustrato preferible para la endorribonucleasa efectora no específica dependiente de cOA es una molécula de ARN que está etiquetada con una molécula de reportero fluorescente en un extremo y un extintor en el otro extremo. La proximidad del reportero al extintor impide la detección de su fluorescencia. La escisión del sustrato mediante la activación de la endorribonucleasa efectora no específica dependiente de cOA rompe la proximidad entre el reportero y el extintor y, por lo tanto, permite la emisión no extinta de la fluorescencia, la cual se puede
45 detectar después de la excitación con un láser. Por lo tanto, un aumento en la actividad de la endorribonucleasa efectora no específica dependiente de cOA provoca un aumento proporcional de la fluorescencia debido a la escisión del sustrato y la eliminación del extintor que extingue al reportero fluorescente.

50 Separado de la activación de la endorribonucleasa efectora no específica, o además de ello, la determinación de un nivel de reconocimiento de la diana también se puede realizar mediante la determinación de la activación de la actividad de la ADNasa efectora no específica que está presente en los complejos efectores CRISPR/Cas Tipo IIIA utilizando un sustrato adecuado para dicha nucleasa. Dicho sustrato adecuado es preferiblemente una molécula de ADN que está etiquetada con una molécula de reportero fluorescente en un extremo y un extintor en el otro extremo. La proximidad del reportero al extintor impide la detección de su fluorescencia. La escisión del sustrato mediante la activación de la ADNasa efectora no específica dependiente de cOA rompe la
55 proximidad entre el reportero y el extintor y, por lo tanto, permite la emisión no extinta de la fluorescencia, la cual se puede detectar después de la excitación con un láser. Por lo tanto, un aumento en la actividad de la ADNasa efectora no específica dependiente de cOA provoca un aumento proporcional en la fluorescencia debido a la escisión del sustrato y la eliminación del extintor que extingue al reportero fluorescente. El uso tanto

de la activación de la endorribonucleasa efectora no específica como de la activación de la ADNasa efectora no específica permite determinar la presencia o ausencia de dos moléculas de ARN diana independientes en un único ensayo, siempre que se utilicen dos complejos de ribonucleoproteína independientes, uno de los cuales activa específicamente a la ADNasa efectora no específica mientras que el otro permite específicamente la determinación indirecta o directa de los niveles de cOA. Un experto en la técnica entenderá que, para ello, las etiquetas fluorescentes que están presentes en el sustrato mediante la activación de la endorribonucleasa efectora no específica dependiente de cOA y de la ADNasa efectora no específica, deben ser lo suficientemente diferentes para permitir la determinación de un nivel de cada actividad como se mide para determinar un nivel de cOA.

Las etiquetas fluorescentes preferibles se pueden seleccionar de Atto425 (ATTO-TEC GmbH, Siegen, Germany), Atto 647N (ATTO-TEC GmbH, Siegen, Germany), YakimaYellow (Epoch Biosciences Inc, Bothell, WA, USA), Cal610 (BioSearch Technologies, Petaluma, CA, USA), Cal635 (BioSearch Technologies, Petaluma, CA, USA), FAM (Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA, USA), TET (Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA, USA), HEX (Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA, USA), colorantes de cianina tales como Cy5, Cy5.5, Cy3, Cy3.5, Cy7 (Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA, USA), colorantes Alexa (Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA, USA), Tamra (Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA, USA), ROX (Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA, USA), JOE (Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA, USA), isotiocianato de fluoresceína (FITC, Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA, USA), Yakima Yellow® (YY; Epoch Biosciences, Bothell, Washington) y tetrametilrodamina (TRITC, Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA, USA). Dicho sustrato está etiquetado preferiblemente en el extremo 5' con una etiqueta detectable, preferiblemente una etiqueta fluorescente.

Los extintores, por ejemplo, tetrametilrodamina TAMRA, ligante del surco menor de tripéptido dihidrociclopirroloindol, son conocidos en la técnica. Los extintores preferibles incluyen Black Hole Quencher®-1 (BHQ1) y BHQ2 (Biosearch Technologies, Petaluma, CA, USA). El extintor oscuro BHQ1 tiene una fuerte absorción de 480 nm a 580 nm, lo que proporciona extinción de fluoróforos que fluorescen en este intervalo, tal como los colorantes FAM, TET, CAL Fluor® Gold 540, JOE, HEX, CAL Fluor Orange 560 y Quasar® 570. El extintor oscuro BHQ2 tiene una fuerte absorción de 599 nm a 670 nm, lo que proporciona extinción de fluoróforos que fluorescen en este intervalo, tal como los colorantes Quasar® 570, TAMRA, CAL Fluor® Red 590, CAL Fluor Red 610, ROX, CAL Fluor Red 635, Pulsar® 650, Quasar 670 y Quasar 705. BHQ1 y BHQ2 pueden extinguir la fluorescencia mediante mecanismos de extinción estáticos y FRET.

El kit de prueba de laboratorio RNaseAlert® v2 (ThermoFisher Scientific; Waltham, MA) proporciona un sustrato comercial adecuado.

Una endorribonucleasa efectora no específica dependiente de cOA preferible es la de un organismo termófilo tal como *Pyrococcus furiosus*, *Sulfolobus solfataricus* y *Thermus thermophilus*, lo que permite la detección simultánea e isotérmica de la actividad de la endorribonucleasa efectora no específica dependiente de cOA.

Los métodos y medios para determinar indirectamente un nivel de oligoadenilato cíclico (cOA) incluyen preferiblemente una endorribonucleasa efectora no específica dependiente de cOA y un sustrato de dicha endorribonucleasa efectora no específica dependiente de cOA.

4.3 Producción de proteínas

El sistema de detección de ácido ribonucleico de acuerdo con la invención se basa en el ensamblaje *in vitro* de un complejo de ribonucleoproteína, preferiblemente un complejo Tipo IIIB. Las proteínas Cas requeridas son preferiblemente de un organismo termófilo tal como *Thermus thermophilus*. Dichas proteínas se expresan y purifican preferiblemente a partir de un sistema de expresión adecuado.

Los sistemas de expresión comúnmente utilizados para la producción de proteínas heterólogas incluyen *E. coli*, *Bacillus* spp., baculovirus, levaduras, hongos, más preferiblemente hongos filamentosos o levaduras tal como *Saccharomyces cerevisiae* y *Pichia pastoris*, células eucariontes tal como células de ovario de hámster chino (CHO), células de riñón embrionario de humano (HEK) y células PER.C6® (Thermo Fisher Scientific, MA, USA) y plantas. La eficiencia de la expresión de proteínas recombinantes en sistemas heterólogos depende de muchos factores, tanto a nivel transcripcional como a nivel traduccional.

Las proteínas Cas se producen preferiblemente utilizando células procariontes, preferiblemente *E. coli*. Dichas proteínas Cas se producen preferiblemente mediante clonación de expresión de las proteínas en una célula procarionte de interés, preferiblemente *E. coli*. Dicha construcción de expresión, preferiblemente ADN, se produce preferiblemente mediante tecnologías recombinantes, que incluyen el uso de polimerasas, enzimas de restricción y ligasas, como es conocido por un experto en la técnica. Alternativamente, dicha construcción de expresión se proporciona mediante síntesis génica artificial, por ejemplo, mediante síntesis de oligonucleótidos superpuestos parcial o completa, o mediante una combinación de química orgánica y tecnologías recombinantes, como es conocido por un experto en la técnica.

Como una alternativa, o adicionalmente, las proteínas Cas se pueden aislar de un organismo termófilo mediante la expresión de una proteína Cas etiquetada en dicho organismo termófilo y el aislamiento del complejo de ribonucleoproteína que comprende dichas proteínas Cas sobre la base de la etiqueta. Dichos complejos de ribonucleoproteína aislados se pueden aislar utilizando la proteína Cas etiquetada.

5 Dicha construcción de expresión está preferiblemente optimizada por codones para mejorar la expresión de las proteínas Cas en una célula procarionte de interés, preferiblemente *E. coli*. La optimización adicional incluye preferiblemente la eliminación de sitios de corte y empalme crípticos, la eliminación de colas de poliA crípticas y/o la eliminación de secuencias que conducen a un plegamiento desfavorable del ARNm. Además, la construcción de expresión codifica preferiblemente para una señal de exportación de proteínas para la
10 secreción de las proteínas Cas fuera de la célula hacia el periplasma de los procariontes, lo que permite una purificación eficiente de las proteínas Cas.

Los métodos para la purificación de las proteínas Cas son conocidos en la técnica y se basan generalmente en cromatografía, tal como cromatografía de afinidad y cromatografía de intercambio iónico, para eliminar
15 contaminantes. Además de los contaminantes, también puede ser necesario eliminar derivados indeseables del propio producto, tal como productos de degradación y agregados. Los pasos adecuados del proceso de purificación se proporcionan en Berthold and Walter, 1994 (Berthold and Walter, 1994. Biologicals 22: 135-150).

Como una alternativa, o adicionalmente, las proteínas Cas recombinantes se pueden etiquetar con una o más etiquetas específicas mediante ingeniería genética para permitir que la proteína se adhiera a una columna específica para la etiqueta y, por lo tanto, se aisle de las impurezas. A continuación, la proteína purificada se
20 intercambia desde la columna de afinidad con un reactivo de desacoplamiento. El método se ha aplicado cada vez más para purificar proteínas recombinantes. Las etiquetas convencionales para proteínas, tal como la etiqueta de histidina, se utilizan con una columna de afinidad que captura específicamente la etiqueta (por ejemplo, una columna Ni-IDA para la etiqueta de histidina) para aislar la proteína de otras impurezas. Entonces, la proteína se intercambia desde la columna utilizando un reactivo de desacoplamiento de acuerdo con la
25 etiqueta específica (por ejemplo, imidazol para la etiqueta de histidina). Este método es más específico, cuando se compara con los métodos de purificación tradicionales.

Las etiquetas adicionales adecuadas incluyen el dominio c-myc (EQKLISEEDL), la etiqueta de hemaglutinina (YPYDVPDYA), la proteína de unión a maltosa, la glutatión-S-transferasa, el péptido de etiqueta FLAG, el péptido aceptor de biotina, el péptido de unión a estreptavidina y el péptido de unión a calmodulina, como se
30 presenta en Chatterjee, 2006 (Chatterjee, 2006. Cur Opin Biotech 17, 353-358). Los métodos para emplear estas etiquetas son conocidos en la técnica y se pueden utilizar para purificar proteínas Cas.

Los métodos para la expresión de proteínas en *E. coli* son conocidos en la técnica y se pueden utilizar para la expresión y purificación de las proteínas Cas.

En un método preferible, las proteínas Cas se expresan en *E. coli* a partir de una construcción de expresión optimizada por codones. Dicha construcción se coloca en un plásmido de expresión bicistrónico que contiene una etiqueta Strep y la secuencia de aminoácidos Glu-Asn-Leu-Tyr-Phe-Gln-(Gly/Ser) en el N terminal, cuya
35 secuencia de aminoácidos es reconocida por una proteasa del virus del grabado del tabaco (TEV). El plásmido de expresión se transforma en *E. coli*, por ejemplo, en la cepa B121(DE3). Después del crecimiento a 37 °C en el volumen de cultivo deseado, hasta una OD600 de ~0.6, el cultivo se coloca en hielo durante 1 hora, después de lo cual se añade isopropil β-D-1-tiogalactopiranosido a una concentración final de 0.1 mM. A continuación, el cultivo se incuba a 18 °C durante ~16 horas (durante la noche). Las células se cosechan y se lisan en
40 amortiguador A (100 mM de Tris-HCl, 150 mM de NaCl) mediante sonicación y, posteriormente, se centrifugan a 30.000 g durante 45 minutos. El lisado clarificado se filtra y se corre sobre una columna de FPLC StrepTrap (GE Healthcare, Chicago, IL) pre equilibrada. Después de lavar la columna con el amortiguador A hasta que no haya más proteína presente en el flujo no unido, la proteína de interés se eluye utilizando el amortiguador B (100 mM de Tris-HCl, 150 mM de NaCl y 2.5 mM de D-destiobiotina). La proteína se escinde de la etiqueta de afinidad mediante la adición de proteasa TEV y se deja incubar durante la noche a 4 °C. La proteína de interés se separa de la mezcla mediante un paso de cromatografía de afinidad HisTrap y StrepTrap, del que se recolecta el flujo no unido. Si es necesario, se añade una cromatografía de exclusión por tamaño adicional para
50 lograr una mayor pureza.

Las proteínas Cas preferibles comprenden proteínas Csm o Cmr, al menos Cmr 1 y Cmr 4, preferiblemente Cmr 1-6, o al menos Csm 2 y Cas10 (Csm1), preferiblemente Csm 2-5 y Cas 10, más preferiblemente Csm 1-6.

Las proteínas preferibles incluyen proteínas que tienen al menos 80% de identidad de secuencia con las secuencias de aminoácidos a las que se hace referencia en la Tabla 2, preferiblemente al menos 90 % de identidad de secuencia, preferiblemente son proteínas con secuencias de aminoácidos a las que se hace referencia en la Tabla 2. Sin embargo, también se pueden utilizar mutantes de dichas proteínas, incluyendo mutantes de inserción, mutantes de delección, proteínas quiméricas y proteínas sustituidas con aminoácidos en un sistema de ácido ribonucleico basado en CRISPR de acuerdo con la invención.

Para aumentar la sensibilidad del método de detección CRISPR/Cas Tipo III, se crean preferiblemente complejos Cmr y/o Csm mutantes catalíticamente muertos y se utilizan en un sistema de detección de la invención. El término "catalíticamente muerto" se refiere a la actividad de digestión del ARN diana del sistema de ácido ribonucleico basado en CRISPR de acuerdo con la invención. Estos mutantes se denominan dCmr y dCsm. Las mutaciones se introducen en las subunidades Cmr4 y Csm3 que son responsables de la unión y escisión de la diana y se seleccionan para la abolición de la escisión de la diana, mientras que mantienen la unión a la diana. Se han descrito diversas mutaciones en la proteína Cmr4 (H15A, D26A, E277A), observándose el deterioro catalítico más fuerte en las mutaciones D26A y D26N de Cmr4 (Benda et al., 2014. *Molecular Cell* 56: 43-54; Ramia et al., 2014. *Cell Reports* 9: 1610-1617). Se ha demostrado experimentalmente que esta mutación de inactivación funciona en *Pyrococcus furiosus* y los alineamientos de secuencias de los ortólogos de Cmr4 muestran que este aminoácido está altamente conservado (datos no mostrados). Además, los datos de cristalografía muestran que este aminoácido en particular se encuentra en un surco del complejo donde se espera que se una el ARN diana (datos no mostrados). En conjunto, estos resultados indican que el residuo de aminoácido D26 es importante para la actividad catalítica de Cmr4. La alteración de este residuo dará como resultado un mutante dCmr4 de *Thermus thermophilus*. Al lado de esto, el alineamiento de la secuencia de aminoácidos de Pf_Cmr4 con ortólogos de Csm3 también muestra que D26 es uno de los pocos aminoácidos que se conserva entre los dos sistemas Tipo III y, por lo tanto, también podría utilizarse para crear un mutante dCsm3. Mutaciones adicionales de escisión muerta incluyen un doble mutante E227A y E228 de Cmr4, y D86A de Cmr4 (Ramia et al., 2014. *Cell Reports* 9: 1610-1617; Zhu and Ye, 2015. *Nucleic Acids Res* 43: 1257- 1267). Además, un D32A de Csm3 es un buen candidato para un mutante de Csm Tipo IIIA de escisión muerta (Samai et al., 2015. *Cell* 161: 1164-1174).

Adicionalmente, Jia et al. y Park et al. describen un mutante dCsm3 creado por la sustitución de D36A (Jia et al., 2019. *Mol Cell* 73: 264-277; Park et al., 2017. *EMBO reports* 18: 826-840). También se mencionó un doble mutante, K56A y R60A, pero no eliminó por completo la escisión de la diana en Csm3.

Un tipo adicional de mutación se basa en un control de daños por parte del sistema de defensa natural basado en CRISPR/Cas. Después de la unión de cOA en un dominio de plegamiento de Rossmann asociado a CRISPR (CARF) de Csx1/Csm6, su dominio de unión de nucleótidos de eucariontes superiores y procariontes (HEPN) se activa y la proteína comenzará a escindir ARN indiscriminadamente (Kazlauskienė et al., 2017. *Science* 357: 605-609). En el entorno biológico normal, el propio Csx1/Csm6 degrada cOA para evitar la activación sostenida y, por lo tanto, la actividad sostenida de la ARNasa (Athukoralage et al., 2019. *J Mol Biol* 431: 2894-2899, García-Doval et al., 2020. *Nature Communications* 11: 1-9). Recientemente, se dilucidó el mecanismo de degradación de la cOA mediante el uso de versiones mutantes de la proteína Csx1/Csm6. Se demostró que un mutante T10A, T10A/T11A o T11A de Csx1/Csm6 no fue capaz de degradar la cOA y resultó en una actividad prolongada de la ARNasa (Athukoralage et al., 2019. *J Mol Biol* 431: 2894-2899; García-Doval et al., 2020. *Nature Communications* 11: 1-9). Esta actividad prolongada de la ARNasa por Csx1/Csm6, por ejemplo, mediante el empleo de un mutante T10A, T10A/T11A o T11A de Csx1/Csm6 o equivalente del mismo, se puede aprovechar para una lectura más sensible y rápida con fines de diagnóstico.

4.4 Ensamblaje de complejos de ribonucleoproteína

Aunque existen diferencias entre los distintos subtipos Tipo III (Cmr, Csm), se ha descrito una estructura general que consta de múltiples subunidades de Cas7 y Cas 11 (Staals et al., 2013. *Mol. Cell* 52: 135-145; Staals et al., 2014. *Mol. Cell* 56: 518-530), las cuales están rematadas en un lado por Cas5 y Cas10. De estas, Cas7 proporciona la actividad de ARNasa tras el reconocimiento del ARN diana por la guía de ARN precargada. Adicionalmente, este reconocimiento también da como resultado la actividad de ADNasa por el dominio HD de Cas10 (Kazlauskienė et al., 2016. *Mol Cell* 62: 295-306).

Los sistemas CRISPR/Cas Tipo III se pueden diferenciar adicionalmente en diversos subtipos, incluyendo Csm Tipo IIIA y Cmr Tipo IIIB (Staals et al., 2013, 2014. *Ibid*). El complejo efector de Cmr de *Thermus thermophilus* (ttCmr46) consta de 12 subunidades con la estequiometría de Cmr₁₂₃₄₅₆₁ (Staals et al., 2014. *Ibid*; Taylor et al., 2015. *Science* 348: 581-586) y un ARNcr de 46 nt. Una nueva investigación de Staals et al. ha revelado un complejo similar con un ARNcr de 40 nt (Tabla 1).

Tabla 1. Composición de subunidades de TtCmr40 y 46

Cmr- 46	Cmr- 40	
1x	1x	Cmr1 (tipo Cas7)
1x	1x	Cmr2 (Cas10, LS)
1x	1x	Cmr3 (Cas5)
4x	3x	Cmr4 (Cas7)

ES 2 999 908 T3

3x	2x	Cmr5 (SS)
1x	1x	Cmr6 (tipo Cas7)

Los complejos Csm Tipo IIIA se componen de una manera similar a Cmr (Csm 1₁2₃3₅4₁5₁) (Tamulaitis et al., 2017. Trends Microbiol 25: 49-61). Este complejo se puede ensamblar añadiendo todas las subunidades en las proporciones molares correctas y dejando que la mezcla de reacción se incube durante un período de tiempo, por ejemplo 30 minutos, a la temperatura de incubación, por ejemplo 60 °C o 65 °C.

Las proteínas Cas purificadas, tal como las proteínas Csm o Cmr, se ensamblan sobre un ARNcr adecuado. En una realización, dicho ARNcr y el complejo de ribonucleoproteína ensamblado están presentes en una solución acuosa. Si es necesario para la determinación posterior de un nivel de cOA, una de las proteínas Cas, por ejemplo, una CAP Cas tal como Cmr 6, se puede etiquetar, por ejemplo, con una etiqueta de histidina y/o una etiqueta strep, y unirse a una superficie, preferiblemente en una posición definida en una superficie. Dicha superficie puede ser una superficie sólida, tal como vidrio, plástico o silicio. Dicha superficie puede estar presente en un receptáculo como una copa, por ejemplo, un tubo Eppendorf, o en un pocillo de una microplaca, o en un dispositivo.

La investigación reciente de Mogila et al. ha revelado las funciones de las subunidades individuales de Csm de *Streptococcus thermophilus* (StCsm) (Mogila et al., 2019. Cell Reports 26: 2753-2765). Además, se diseñó un complejo Csm mínimo que solo contiene subunidades Csm3, Csm4 y Cas10 (Cmr1) (y ARNcr), el cual aún conserva las tres actividades catalíticas (ARNasa, csDNasa, cOA sintasa).

La eliminación de diversas subunidades mientras se conservan todas las actividades catalíticas es prometedora para la integración en el uso práctico de los sistemas CRISPR/Cas Tipo III. Más notablemente, no se reportó que la producción de cOA se viera afectada (Mogila et al., 2019. *Ibid*).

Estos complejos mínimos incluirían, como lo describen Mogila et al., Cmr1, 3 y 4 para CRISPR/Cas Tipo IIIA, y Cmr2, 3 y 4 para CRISPR/Cas Tipo IIIB, siendo posible la variación de los números de copias de estas subunidades. Para aumentar la producción de cOA y la especificidad y sensibilidad de la detección de la diana, se puede aumentar el número de subunidades de Csm3/Cmr4.

Adicionalmente, estas subunidades se pueden mutar para optimizar su actividad.

Dichas proteínas Cmr se proporcionan preferiblemente a un ARNcr adecuado con una estequiometría de Cmr1:Cmr3:Cmr4:ARNcr de 1:1:4:1, y de Cmr1:2:3:4:5:6:ARNcr de 1:1:1:4:3:1:1.

Un complejo de nucleoproteína se puede ensamblar en un ARNcr de TtCmr46 de la siguiente manera: Primero, se añadieron 3.5 µL de ARNcr (700 ng) a 3.5 µL de amortiguador Cmr1X (20 mM de Tris HCl pH 8.0, 150 mM de NaCl). Posteriormente, las subunidades se añadieron a la mezcla de reacción en un orden específico (Cmr3, Cmr2, Cmr4, Cmr5, Cmr6, Cmr1) hasta una concentración final de .5 µM, 2.5 µM, 10 µM, 7.5 µM, 2.5 µM y 2.5 µM, respectivamente, para completar un volumen de reacción total de 20 µL. La mezcla de reacción se puede incubar a 65 °C durante 30 minutos.

Un método preferible para reconstituir un complejo de Clase I, Tipo 3A comprende la adición de 3.5 µL de ARNcr (700 ng) a 3.5 µL de amortiguador Cmr 1X (20 mM de Tris-HCl pH 8.0, 150 mM de NaCl), seguido de la adición de las subunidades en el orden Csm4, Csm1, Csm3, Csm2, Csm5 hasta una concentración final de 2.5 µM, 2.5 µM, 12.5 µM, 7.5 µM y 2.5 µM, respectivamente, para formar un volumen de reacción total de 20 µL. La mezcla de reacción se puede incubar a 60 °C o 65 °C durante 30 minutos.

Tabla 2. Secuencias preferibles de Cmr y Csm

Nombre de la subunidad	Nombre de Cas	Etiqueta del locus de <i>T. thermophilus</i>	Identificador de Uniprot	Identificador de GeneID
Cmr1	Tipo Cas7	tthb 162	Q53W07	3169605
Cmr2	Cas10	tthb 160	Q53W09	3169601
Cmr3	Cas5	tthb 161	Q53W08	3169600
Cmr4	Cas7	tthb 163	Q53W06	3168402
Cmr5	Cas11	tthb 164	Q53W05	3169607
Cmr6	Tipo Cas7	tthb 165	Q53W04	3168401
Subunidad	Nombre de Cas	Etiqueta del locus de <i>T. thermophilus</i>	Identificador de Uniprot	Identificador de GeneID
Csm1	Cas10	tthb 147	Q53W19	3169523

Csm2	Cas11	tthb 148	Q53WF6	3169530
Csm3	Cas7	tthb 149	Q53WF5	3169534
Csm4	Cas5	tthb 150	Q53WF4	3169524
Csm5	Tipo Cas7	tthb 151	Q53W18	3169228
Csm6	Csx1	tthb 144	Q53W22	3169588
Csm6	Csx1	tthb 152	Q53W17	3169219
Csm6	Csx1	tthb 155	Q53W14	3169545

Los identificadores de GeneID provienen de la base de datos de genes de genomas de NCBI RefSeq

4.5 Métodos de detección de ARN

Los sistemas CRISPR/Cas convencionales que se utilizan con fines de diagnóstico, por ejemplo, Cas12/Cas14 (UC Berkeley, CA, USA) y los sistemas basados en Cas13 (Broad Institute, MA, USA), son dependientes de la presencia de un motivo específico adyacente al sitio diana. Este mecanismo, en el entorno biológico, se utiliza para discriminar lo propio de lo ajeno. Sin este motivo, estas proteínas Cas no son capaces de escindir su diana y su uso como sistema de diagnóstico no es posible. Para Cas12 y Cas13, estos motivos se denominan motivo adyacente al protoespaciador (PAM) y sitio flanqueante del protoespaciador (PFS), respectivamente [Westra et al., 2013. PLoS Genet 9:e1003742; Abudayyeh et al., 2016. Science 353: aaf5573]. En el caso de algunas proteínas Cas12/Cas14, este PAM requerido es TTTN/TTTA, lo que limita en gran medida la elección de secuencias diana. Para Cas13, el motivo requerido es limitante en menor medida, y favorece un nucleótido H (A, C, U) adyacente a la secuencia diana.

Los sistemas CRISPR Tipo III(B) emplean un mecanismo propio versus no propio diferente el cual evita la autoinmunidad al verificar la complementariedad entre la etiqueta de repetición 5' del ARNcr y la secuencia flanqueante del protoespaciador 3' correspondiente [Guo et al., 2019. RNA Biol 16: 1513-1520]. La complementariedad entre estas dos regiones afecta la producción relativa de cOA hasta cierto grado, pero no se requiere una determinada secuencia tipo PAM/PFS para que el Tipo III funcione como se desea, lo que proporciona una gran ventaja sobre los sistemas que se utilizan actualmente [Guo et al., 2019. RNA Biol 16: 1513-1520].

Por otra parte, el uso de la selección de dianas de Cas13 también está limitado por las posibles estructuras secundarias que se forman en el ARN diana [Smargon et al., 2017. Mol Cell 65: 618-630]. Las aplicaciones de diagnóstico que se utilizan actualmente funcionan a 37 °C, en contraste con el sistema Tipo IIIB para *Thermus thermophilus* el cual funciona a 65 °C [Staals et al., 2013. Mol Cell, 52: 135-145]. Esta temperatura elevada reduce la cantidad de estructuras de ARN secundarias que se forman potencialmente en secuencias de ARN diana [Wan et al., 2012. Mol Cell 48: 169-181].

Los métodos de la invención para detectar secuencias de ARN específicas se pueden utilizar en el cuidado de la salud humana, diagnósticos veterinarios, detección de patógenos vegetales, detección de contaminantes del agua y la detección de contaminantes de comida y alimentos. Además, los métodos de la invención para detectar secuencias de ARN específicas se pueden utilizar para detectar organismos benéficos. En general, los métodos de la invención se pueden utilizar para la detección de patógenos bacterianos, fúngicos, de arqueas, de protistas, de protozoarios, de eucariontes, de virales y de viroides. Además, los métodos de la invención también se pueden utilizar para la detección y el diagnóstico de alteraciones genéticas o rasgos que se expresan como moléculas de ARN, en humanos, animales y plantas.

Para el cuidado de la salud humana y el diagnóstico veterinario, el material de ácido nucleico, incluyendo ARN, se aísla preferiblemente de un fluido biológico, preferiblemente de líquido cefalorraquídeo, saliva, secreción nasofaríngea, secreción orofaríngea, sudor, orina, heces o sangre. El término "sangre" incluye plasma sanguíneo, el cual se prepara mediante la eliminación de glóbulos rojos y blancos, por ejemplo, mediante centrifugación, y suero sanguíneo, el cual se prepara mediante la formación de un coágulo sanguíneo y la eliminación del coágulo utilizando, por ejemplo, una centrífuga. Un fluido biológico preferible es sangre. Los métodos y composiciones para el aislamiento del material de ácido nucleico de fluidos biológicos, particularmente sangre, emplean preferiblemente disolventes acuosos sin el uso de disolventes orgánicos y sales caotrópicas.

Si es necesario, el material de ácido nucleico, incluyendo el ARN, se puede purificar a partir de una muestra utilizando, por ejemplo, una combinación de métodos físicos y químicos. Se utilizan preferiblemente sistemas disponibles comercialmente para el aislamiento de ácidos nucleicos, como el sistema de extracción de ácidos nucleicos NucliSENS® easyMAG® o NucliSENS® miniMAG® (bioMérieux, Marcy l'Etoile, France), o un sistema MagNA Pure 96 (Roche Diagnostics, Almere, The Netherlands).

Para esto, el ARN se puede aislar de una muestra mediante cualquier técnica conocida en la técnica, incluyendo, pero no limitado a kits de aislamiento de ARN comerciales adecuados que incluyen Trizol (Invitrogen; Carlsbad, California), RNAqueous® (Applied Biosystems/Ambion, Austin, Tx), Qiazol® (Qiagen, Hilden, Germany), kits de aislamiento de ARN total Agilent (Agilent; Santa Clara, California), RNA-Bee® (Tel-

Test. Friendswood, Texas), el minikit RNeasy (Qiagen, Venlo, The Netherlands) y el kit de purificación de ARN total Maxwell™ 16 (Promega; Madison, Wisconsin). El ARN aislado, preferiblemente ARNm, se transcribe preferiblemente de forma reversa con la ayuda de una ADN polimerasa dependiente de ARN para formar ADNc de cadena sencilla o de cadena doble.

5 El uso de CRISPR/Cas Tipo III de acuerdo con la invención para fines de diagnóstico incluye, pero no se limita a, diagnósticos médicos tales como la detección de infecciones del tracto urinario, infecciones del tracto respiratorio, especialmente del SARS-CoV-2 y del virus respiratorio sincitial (RSV), infecciones de la sangre (sepsis), expresión de marcadores de resistencia a antibióticos tal como marcadores de *Staphylococcus aureus* resistente a la meticilina y marcadores de betalactamasas de espectro extendido, infecciones
10 gastrointestinales, infecciones de la piel, infecciones odontogénicas, infecciones vaginales tal como *Candidiasis*, *Trichomonas vaginalis* y *Gardnerella*, infecciones del sistema reproductor masculino, enfermedades infecciosas trópicas tales como malaria, tripanosomiasis, fiebre del dengue, fiebre del Zika, fiebre de Chikungunya, detección de enfermedades de transmisión sexual causadas por *Chlamydia* spp., gonorrea, virus de inmunodeficiencia humana, Herpes spp., sífilis y defectos genéticos, incluyendo cáncer y
15 enfermedades autoinmunes.

El CRISPR/Cas Tipo III de acuerdo con la invención se puede utilizar adicionalmente para diagnósticos veterinarios, incluyendo la detección de enfermedades infecciosas del ganado, tales como mastitis, lengua azul, fiebre aftosa, *Salmonella* spp., *Klebsiella* spp., *Campylobacter* spp., enfermedades infecciosas del cerdo, tal como enfermedades respiratorias, dermatitis, diarrea e infecciones por parvovirus porcino; enfermedades
20 infecciosas de ovejas y cabras, tal como enfermedades clostridiales, llagas bucales, neumonía e infecciones por el virus de la enfermedad del Valle del Rift; enfermedades infecciosas de las aves de corral, tal como bronquitis infecciosa, *Salmonella* spp.; enfermedades infecciosas felinas, tal como infecciones con el virus de la inmunodeficiencia felina (FIV) y el virus de la leucemia felina (FeLV), infecciones respiratorias; enfermedades infecciosas caninas, tal como rabia e infecciones por *Bordetella*, *Leptospira* y *Borrelia*.

25 El sistema de detección CRISPR/Cas Tipo III de acuerdo con la invención se puede utilizar adicionalmente para la detección de patógenos vegetales, tal como la detección de determinados hongos, tal como las especies de *Ascomycetes* y las especies de *Basidiomycetes*, determinados organismos tipo hongos, tal como oomicetos y fitomixea, determinadas bacterias, tal como *Burkholderia*, proteobacteria y especies de *Pseudomonas*; virus, viroides y organismos tipo virus, tal como el virus del mosaico del tabaco, el virus del mosaico de la coliflor;
30 nematodos, tal como *Meloidogyne chitwoodi* y *M. fallax*; y protozoos y algas, tal como *Phytophthora* y *Cephalosporium*.

El sistema de detección CRISPR/Cas Tipo III de acuerdo con la invención se puede utilizar adicionalmente para la detección de contaminantes del agua, incluyendo la detección de contaminación bacteriana, como *Vibrio cholerae*, *E. coli*, *Shigella* spp., *Legionella* spp., *Salmonella* spp.; contaminación viral, tal como hepatitis A, hepatitis E, poliovirus; contaminación por algas, como la presencia de *Desmodesmus* spp.; y contaminación
35 parasitaria, tal como la presencia de *Dracunculiasis* spp.

El sistema de detección CRISPR/Cas Tipo III de acuerdo con la invención se puede utilizar adicionalmente para la detección de contaminantes de comida y alimentos, incluyendo la contaminación bacteriana, tal como la presencia de *Clostridium botulinum*, *E. coli*, *Listeria* spp., *Salmonella* spp., *Vibrio cholerae*; contaminación viral,
40 tal como la presencia de Enterovirus spp., hepatitis A, norovirus spp. y rotavirus spp.; contaminación parasitaria, tal como la presencia de *Giardia* spp. y *Trichinella* spp.; y contaminación fúngica.

Más específicamente, el sistema de detección CRISPR/Cas Tipo III de acuerdo con la invención se puede utilizar adicionalmente para la detección de cualquier organismo, ya que todos los organismos generan ARN durante la infección. Dichos organismos incluyen bacterias tales como especies de *Bacillus*, especies de
45 *Clostridium*, especies de *Enterobacter*, especies de *Escherichia*, especies de *Enterococcus*, especies de *Klebsiella*, especies de *Listeria*, especies de *Legionella*, especies de *Salmonella*, especies de *Staphylococcus*, especies de *Streptococcus* y combinaciones de las mismas; virus que incluyen virus de ADN tales como el virus de la hepatitis B, adenovirus, virus del papiloma humano; virus de ARN tal como el virus de la Influenza, hepatitis A/C/D/E, virus de la polio, virus de mosaico del tabaco, Coronavirus y VIH; viroides; Arqueas; hongos tal como especies de *Aspergillus*, especies de *Ascomycetes*, especies de *Candida*; protozoos; y parásitos tal como especies de *Trypanosoma*.

El uso del sistema de detección CRISPR/Cas Tipo III de acuerdo con la invención para la detección de ARN encontrará un beneficio explícito en un entorno de diagnóstico. Dos de dichas configuraciones de diagnóstico se detallarán a continuación en la presente memoria. Sin embargo, un experto en la técnica podrá sin duda
55 encontrar configuraciones de diagnóstico adicionales que se beneficiarán del sistema de detección CRISPR/Cas Tipo III de acuerdo con la invención para la detección de ARN.

Un primer ejemplo lo ilustran los recientes acontecimientos mundiales. La detección precisa en el punto de atención (PoC) aportaría muchos beneficios en la pandemia de COVID-19. El reciente brote de SARS-CoV-2, que dio lugar a la pandemia de COVID-19, se ha propagado por todo el mundo en cuestión de meses desde

su descubrimiento. Para frenar la propagación de la enfermedad, muchos países han instituido medidas preventivas que restringen el movimiento y los viajes de su población. Estas restricciones son, en última instancia, para "aplanar la curva", con la intención de mantener manejable la presión sobre los sistemas nacionales de salud y salvar tantas vidas como sea posible.

5 Sin embargo, algunos países aparentemente han podido gestionar el aumento de infecciones de manera mucho más eficaz que otros. El número limitado de infecciones y muertes posteriores en, por ejemplo, Singapur, Corea del Sur y Taiwán parece reflejar el éxito de su rápida respuesta. Un factor importante en este éxito fue su despliegue temprano y generalizado de pruebas masivas y posterior auto cuarentena, algo que otros países no hicieron o no pudieron hacer. Este programa de detección diagnóstica ha ayudado a identificar a las
10 personas infectadas y aislarlas, lo que resultó en una propagación considerablemente más lenta del virus, lo que llevó a menos infecciones y menor mortalidad. Además de esto, la OMS ha expresado la necesidad de pruebas descentralizadas y generalizadas para permitir una respuesta rápida a las pandemias emergentes. La herramienta de diagnóstico más importante utilizada en las pruebas de COVID-19 se basa en (RT)-PCR, la cual detecta el material genético viral (ARN). Si bien esta prueba arroja resultados confiables en 4-6 horas, solamente los laboratorios centralizados están calificados para realizar las pruebas, lo cual requiere el envío de muestras y un tiempo de respuesta esperado por prueba de al menos 24 horas. Incluso en los países desarrollados, la capacidad de prueba aumentada recientemente no satisface las demandas. Las únicas pruebas de PoC disponibles son los inmunoensayos, los cuales no discriminan entre infecciones pasadas y actuales, y no se pueden utilizar para el diagnóstico de fase aguda.

20 Los diagnósticos de detección de ácidos nucleicos CRISPR-Cas ofrecen una solución para establecer una plataforma de detección descentralizada. Se ha afirmado que los diagnósticos basados en CRISPR-Cas son más rápidos que la PCR y más económicos de realizar in situ (Sheridan, 2020. Nat Biotechnol 38: 382-384). Estamos desarrollando una aproximación de diagnóstico de PoC de COVID-19 innovadora y patentada basada en CRISPR-Cas, la cual contribuirá a mejorar la capacidad de monitoreo del virus y, por lo tanto, limitará la
25 propagación del COVID-19 y otros virus.

Un segundo ejemplo lo proporciona la detección de una infección del tracto urinario (UTI). Los diagnósticos actuales de UTI aún no están a la altura de las expectativas. Especialmente en la atención médica de primera línea, el médico generalista tiene que confiar en resultados poco fiables de tiras reactivas con un valor predictivo positivo de solamente 61 %. Esto conduce a un elevado número de tratamientos de pacientes negativos a la
30 enfermedad y a la prescripción innecesaria de antibióticos (Eriksen and Bing-Jonsson, 2016. Forskning 1-42; disponible en sykepleien.no/forskning/2016/09/kan-ikke-stole-blindt-pa-urinstiks).

El diagnóstico de precisión de punto de atención mediante el sistema de detección CRISPR/Cas Tipo III proporcionará importantes ventajas sobre los métodos actuales. Debido a su capacidad para la detección de ARN específico, el sistema de detección CRISPR/Cas Tipo III permite la rápida identificación de especies y la
35 detección de marcadores de resistencia a los antibióticos.

La mayoría de los casos (70-90 %) de UTIs son causados por *E. coli* uropatogénica, pero también pueden ser causados por una gama de otros patógenos (Flores-Mireles et al., 2015. Nat Rev Microbiol 13: 269-284). Identificar qué patógeno específico causa la infección proporcionará información adicional para aumentar la probabilidad de una correcta administración de antibióticos.

40 Por ejemplo, la identificación de patógenos específicos se puede basar en la expresión de especies específicas de ARN ribosomal 16S. Van der Zee et al. (van der Zee et al., 2016. PLOS ONE 11: e0150755) demostraron que la diferenciación entre siete patógenos causantes de UTI puede basarse en la qPCR basada en 16S. En la Tabla 3 se proporcionan algunos ejemplos de los cebadores que se utilizaron (Van der Zee et al., 2016. *Ibid*). Las dianas de estos cebadores se pueden adaptar a las secuencias guía de CRISPR/Cas Tipo III. De manera similar, las regiones de cebadores de PCR para la detección de marcadores de resistencia a antibióticos
45 también se pueden adaptar para que se ajusten a la detección basada en CRISPR/Cas Tipo III.

Otro ejemplo lo proporciona la detección de *Listeria* en productos lácteos crudos. *Listeria monocytogenes* es un patógeno muy conocido transmitido por los alimentos que puede causar listeriosis mortal. Se ha descubierto que *Listeria* contamina alimentos como verduras, productos lácteos y cárnicos. Se ha reportado de la presencia de *Listeria* en el 1-4.4 % de toda la leche cruda en Europa, así como del 1.1 hasta el 65 % en ciertos quesos no pasteurizados (Lundén et al, 2004. J Dairy Science 87, E6 - E12). La detección genética de *Listeria* basada en CRISPR/Cas Tipo III se puede combinar con la detección de otros patógenos potenciales como *Escherichia coli*, *Salmonella typhimurium* y *Campylobacter jejuni*.

55 La detección rápida de patógenos transmitidos por alimentos mediante diagnósticos rápidos podría prevenir potencialmente el uso y consumo de productos lácteos contaminados. Permitir esta detección en la granja evitaría el transporte de leche contaminada a la planta de procesamiento de productos lácteos y evitaría la posible propagación de la contaminación, disminuyendo la posibilidad de *listeriosis*.

Como en el primer ejemplo, la detección de ARN basada en CRISPR/Cas Tipo III se puede diseñar basándose en secuencias diana de PCR similares. Pueden surgir complicaciones en el pretratamiento potencialmente requerido de la leche, así como en el probable límite de detección bajo requerido.

5 Si es necesario, por ejemplo, para aumentar los niveles de detección, los métodos de la invención para detectar secuencias de ARN específicas pueden ir precedidos por la amplificación de secuencias diana. La amplificación se puede realizar mediante cualquier sistema de amplificación adecuado que incluya, por ejemplo, reacción en cadena de la ligasa (LCR), sistemas de amplificación de ácido ribonucleico isotérmico tal como la amplificación basada en secuencias de ácidos nucleicos (NASBA) y la amplificación de señales de ARN basada en escisión, 10 amplificación mediada por transcripción, amplificación por desplazamiento de cadena y reacción en cadena de la polimerasa (PCR). Como es sabido por un experto en la técnica, el ARN se transcribe preferentemente de reversa antes o durante la reacción de amplificación.

Una reacción de amplificación preferible es una reacción isotérmica de un solo tubo, tal como NASBA, amplificación isotérmica mediada por bucle (LAMP), amplificación dependiente de helicasa (HDA), reacción de amplificación de polimerasa recombinasa (RPA) y reacción de amplificación de enzima de corte (NEAR). Una 15 reacción isotérmica de un solo tubo preferible es una reacción RPA) (TwistDx Ltd., Cambridge, UK).

Dicha reacción isotérmica de un solo tubo, tal como RPA, se integra preferiblemente con el sistema de detección de ácido ribonucleico basado en CRISPR de la invención como un sistema de reacción de "un recipiente". Una ventaja de dicho sistema de un recipiente, o de un solo tubo es un riesgo reducido de contaminación de las muestras o de contaminación cruzada de diferentes muestras.

20 Para la detección de cOA mediante el empleo de un método de detección directa de cOA, las muestras pueden comprender niveles endógenos de PPI y Pi. Especialmente los fluidos biológicos tales como el plasma sanguíneo, suero sanguíneo, orina y líquido sinovial pueden contener cantidades de PPI y Pi de 0.16-3.42 microM y 0.31 mM, respectivamente (plasma sanguíneo); de 3.5 microM y 1-1.5 mM, respectivamente (suero sanguíneo); de 1.5 mM de Pi (orina) y de 0.1 microM y 0.3 mM, respectivamente (líquido sinovial) (Russell et al., 1970. Lancet 296: 899-902; Silcox and McCarty, 1973. J Clin Invest 52: 1863-1870; Bansal, 1990. Serum 25 Inorganic Phosphorus. In: Clinical Methods: The History, Physical, and Laboratory Examinations (Butterworths); Le, 2008. First aid for the USMLE step 1 2018). Estos niveles pueden variar con el tiempo y en el curso de una enfermedad (Armstrong et al., 1975. Clin Chem 21: 104-108).

El pretratamiento de una muestra con altos niveles endógenos de PPI o Pi se puede realizar mediante la 30 eliminación de moléculas pequeñas como Pi y PPI antes de la detección de secuencias de ARN específicas. Se pueden adoptar diversos métodos, incluyendo, pero no limitado a, los métodos enlistados a continuación, para evitar interferencia en la lectura por los niveles endógenos de PPI o Pi, incluyendo la precipitación química, la diálisis y el uso de columnas de intercambio catiónico.

La eliminación de moléculas pequeñas tal como Pi y PPI se puede realizar, por ejemplo, mediante el filtrado de 35 las muestras sobre un filtro con un límite de peso molecular inferior a 1,000, preferiblemente inferior a 500. El límite de peso molecular se define como el peso molecular más bajo (en Daltons) en el que la membrana retiene más del 90 % de un soluto con un peso molecular conocido.

La influencia de las especies de fósforo endógenas en los resultados de la prueba también se puede anular mediante el aislamiento del material genético (entre los que se encuentra la secuencia diana) de las muestras 40 de pacientes y la aplicación posterior en/sobre un medio libre de PPI/Pi. Los métodos para el aislamiento del material de ácido nucleico incluyen, pero no se limitan a, extracción orgánica, extracción de Chelex, extracción en fase sólida, perlas magnéticas y/o intercambio aniónico.

Además de la reducción de los niveles endógenos de Pi, también se requieren pasos de preparación de la 45 muestra para resolver la interferencia en la lectura por otros factores que incluyen, pero no se limitan a, proteasas en muestras de pacientes, concentraciones de sal y pH.

Tabla 3. Cebadores de qPCR específicos como se describe en van der Zee et al. (van der Zee et al., 2016. PLOS ONE 11: e0150755) para la detección de patógenos que causan UTI.

Organismo	diana		oligonucleótidos (5'-3')
<i>E. coli</i>	RfaH	F	TACGCCCGCCGTTGAC
	RfaH	R	AGCCAGCAGGCGCAAA
	RfaH	CY5	AACAGGACGAATACTGACGCGCCA
<i>Klebsiella spp.</i>	CopG	F	CGAAGAAGACGGCATGGAAT

ES 2 999 908 T3

	CopG	R	CGCAGATCCGGAGGTCATTA
	CopG	YY	TCAACGTCAGCTACGCAAGGAGTG
	Pgi	F3	GAAGGTGAAGATGTTTCATAATCACG
	Pgi	R2	CGTGAAATCACGCCGTTTCAG
	Pgi	R3	GCGTGAAATTAAGCCGTTTCAG
	Pgi	YY	CATACAGGGCAATCAGCGCGCC
<i>Citrobacter spp.</i>	MrkC	F1	ATGTGTATACCAATGGTGAAGTGAA
	MrkC	R1	GCCCATTTTGCCGTCTTTT
	MrkC	FAM	CCGCTACGACCTGAATATCACCCGTG
	Cfa	F1	CCTGGTGGCCGGGATT
	Cfa	R1	GTCCAGCGCATTTCAGATGAGT
	Cfa	R3	GGCATCAAGCGCATTAAAGATGTAT
	Cfa	FAM	CCGCAACCCTTTCCGATCTGGAG
<i>Enterobacter spp.</i>	Xx	F1	ACAAAGGAGTCGGGATGAGTTC
	Xx	R1	CGACCATTGCTCGTAAGGCT
	Xx	FAM	CAATCCCAGGCCAAATCACCCGG
	Omp	F2	CCCATGCTTCAGCTTTGTCA
	Omp	R2	CTGCAGGTTACGCTAACTCAA
	Omp	FAM	CGTTGCCGTCACGTTTCTGGTCAA
<i>P. aeruginosa</i>	OprL	F1	GCGTCGAGCTGAAGAAGTAAGAAG
	OprL	R	GGCTGAGCGCGAGGAA
	OprL	CY5	CCCAAGCACCTGCGTGTCTGAC
<i>E. faecalis</i>	RecG	F2	GCGAAATGGATGTATCAATCATTG
	RecG	R	TTTCCATCCATTCTAAAACAGTATCTAACT
	RecG	YY	ACACGTTGGATTTCGGCCGCC
<i>P. mirabilis</i>	Hns	F	GCACGTTTAGCACGACCAGTT
	Hns	R	TGCCGATGGTATTGATCAA
	Hns	FAM	CGCCAGCAGCTTCAAGCAGGTCA

Abreviaturas: F=cebador delantero. R=cebador reverso. CY5, YY y FAM son colorantes fluorescentes.

4.6 Dispositivos adecuados

- El sistema de detección de ácido ribonucleico basado en CRISPR/Cas de acuerdo con la invención está presente preferiblemente en un dispositivo. Dicho dispositivo comprende preferiblemente uno o más sistemas de detección que se dirigen a una o más secuencias de ARN específicas. Dicho dispositivo puede comprender aberturas, tales como puertos de entrada y de salida, para la introducción y extracción de fluidos dentro y desde el dispositivo. Dichas aberturas pueden estar conectadas a válvulas, tubos, canales, cámaras, jeringas y/o bombas. Los dispositivos pueden estar conectados a actuadores de flujo de fluido que permiten el movimiento direccional de fluidos dentro del dispositivo microfluídico. Los actuadores de ejemplo incluyen, pero no se limitan a, bombas de jeringa, bombas de recirculación accionadas mecánicamente, bombas electroosmóticas, bulbos, fuelles, diafragmas o burbujas destinadas a forzar el movimiento de fluidos. En ciertas realizaciones de ejemplo, los dispositivos están conectados a controladores con válvulas programables que trabajan en conjunto para mover fluidos a través del dispositivo. Además, un mecanismo de calentamiento puede ser para la incubación de la mezcla de reacción a una temperatura deseada.
- Dicho sistema de detección de ácido ribonucleico basado en CRISPR/Cas está presente preferiblemente en un biosensor, preferiblemente mediante el uso de un cartucho desechable. Un biosensor preferible proporciona métodos y medios para detectar la interacción del sistema de detección de ácido ribonucleico basado en CRISPR/Cas con un ácido nucleico diana. Un biosensor preferible comprende un lector portátil reutilizable capaz de operarse simplemente con un botón pulsador para el análisis automatizado de muestras, y cartuchos desechables de coste efectivo, preferiblemente cartuchos de sensor microfluídico desechables, que se han funcionalizado para proporcionar una detección y/o cuantificación óptimas de múltiples agentes clínicamente relevantes, tal como patógenos. Un posible biosensor es un dispositivo de prueba de flujo lateral, por ejemplo, basado en la acumulación de sustancias cuantificables, tal como partículas magnéticas.
- En una realización, dicho dispositivo o biosensor es un dispositivo de prueba de punto de atención (POC), el cual es un instrumento o kit de prueba transportable, portátil y de mano que permite recolectar una muestra y

obtener los resultados en un período de tiempo muy corto en o cerca de la ubicación del paciente de modo que el plan de tratamiento se pueda ajustar según sea necesario. Dicho dispositivo comprende preferiblemente medios que permiten una determinación rápida, de bajo coste y confiable de la presencia o ausencia de un ácido nucleico diana y, preferiblemente también, una cuantificación de dicho ácido nucleico diana.

5 Un POC que comprende un sistema de detección de ácido ribonucleico basado en CRISPR/Cas está dirigido preferiblemente a detectar un número limitado de moléculas de ácido nucleico diana, incluyendo 5 o menos moléculas de ácido nucleico diana, 4 o menos moléculas de ácido nucleico diana, 3 o menos moléculas de ácido nucleico diana, tal como 2 moléculas de ácido nucleico diana y 1 molécula de ácido nucleico diana. Para
10 ello, los complejos de ribonucleoproteína de ARNcr están presentes preferentemente en posiciones discretas del sistema de detección de ácido ribonucleico, lo que permite determinar un nivel de cOA para cada uno de los complejos de ribonucleoproteína de ARNcr individuales.

Dicho arreglo que comprende un sistema de detección de ácido ribonucleico basado en CRISPR/Cas se dirige preferentemente a al menos 5 moléculas de ácido nucleico diana diferentes, preferentemente a al menos 10 moléculas de ácido nucleico diana diferentes, preferentemente al menos 20 moléculas de ácido nucleico diana
15 diferentes, preferentemente al menos 50 moléculas de ácido nucleico diana diferentes, preferentemente al menos 100 moléculas de ácido nucleico diana diferentes. Dicho arreglo que comprende un sistema de detección de ácido ribonucleico basado en CRISPR/Cas se dirige preferentemente a entre 2 y 12.000 moléculas de ácido nucleico diana distintas.

Como resultará evidente para un experto en la técnica, dichas diferentes moléculas de ácido nucleico diana pueden todas estar dirigidas a diferentes organismos, de modo que cada una de las moléculas de ARNcr se derive de, y se utilice para detectar, un organismo diana diferente, tal como diferentes bacterias, virus, hongos, protozoos y/o parásitos. Dichas diferentes moléculas de ARNcr también se pueden elegir de modo que un subconjunto de las diferentes moléculas de ARNcr se dirija a los mismos organismos. Dicho subconjunto puede comprender 2 moléculas de ARNcr diferentes, 3 moléculas de ARNcr diferentes, 4 moléculas de ARNcr
20 diferentes, 5 moléculas de ARNcr diferentes. El número de diferentes moléculas de ARNcr que se dirigen al mismo organismo está limitado preferiblemente a un máximo de 10. Será evidente que la detección de un organismo diana por todas las diferentes moléculas de ARNcr proporciona la confirmación de que la identificación del organismo diana es correcta.

Además, una molécula de ARNcr específica puede estar presente en múltiples copias en un sistema de detección de ácido ribonucleico basado en CRISPR/Cas de acuerdo con la invención, por ejemplo, en múltiples pocillos de una placa de micro titulación, tal como una placa de 48 pocillos, una placa de 96 pocillos, una placa de 192 pocillos, una placa de 384 pocillos o una placa de 768 pocillos. La detección de un organismo diana mediante múltiples copias de una molécula de ARNcr proporciona confirmación de que la identificación del organismo diana es correcta.

35 5. Ejemplos

Ejemplo 1

Materiales y métodos

Descripción detallada de la purificación del complejo Cmr y expresión y purificación de las proteínas Cmr recombinantes.

40 Las proteínas Cas y los complejos Cas se purificaron como se describe en Staals et al., 2013 (Staals et al., 2013. Mol Cell 52: 135-145).

Ensayos de actividad *in vitro*

Los sustratos de ARN (Tabla 4) se etiquetaron en 5' con la polinucleótido cinasa T4 (NEB) y en 5' 32P-y -ATP, después de lo cual se purificaron a partir de un PAGE desnaturizante utilizando amortiguador de elución de gel de ARN (0.5 M de acetato de sodio, 10 mM de MgCl₂, 1 mM de EDTA y SDS al 0.1%).
45

Los ensayos de actividad *in vitro* se llevaron a cabo en amortiguador de ensayo de actividad de TtCmr (20 mM de Tris- HCl pH 8.0, 150 mM de NaCl, 10 mM de DTT, 1 mM de ATP y 2 mM de MgCl₂) utilizando el sustrato de ARN etiquetado y 400 nM de TtCmr. A menos que se indique lo contrario, la reacción se incubó a 65 °C durante 1 hora. Se añadió un colorante de carga de ARN (que contenía 95% de formamida) a las muestras después de
50 la incubación hervida a 95 °C durante 5 minutos. Las muestras se corrieron sobre un gel de poliacrilamida desnaturizante al 20 % (que contenía 7 M de urea) durante alrededor de 3-4 horas a 15 mA o durante la noche a una constante de 4 mA. La imagen se visualizó mediante imagenología de fósforo.

Reconstitución del complejo de Cmr46 y Cmr40

Primero, se añadieron 3.5 μ L de ARNcr (700 ng) a 3.5 μ L de amortiguador Cmr1X (20 mM de Tris-HCl pH 8.0, 150 mM de NaCl). Posteriormente, para Cmr46, las subunidades se añadieron a la mezcla de reacción en un orden específico (Cmr3, Cmr2, Cmr4, Cmr5, Cmr6, Cmr1) hasta una concentración final de 2.5 μ M, 2.5 μ M, 2.5 μ M, 10 μ M, 7.5 μ M y 2.5 μ M respectivamente, para completar un volumen de reacción total de 20 μ L. La mezcla de reacción se incubó a 65 °C durante 30 minutos. De manera similar para Cmr40 con la concentración final de las subunidades (Cmr3, Cmr2, Cmr4, Cmr5, Cmr6, Cmr1) siendo 2.5 μ M, 2.5 μ M, 1.875 μ M, 6.66 μ M, 7.5 μ M y 2.5 μ M respectivamente.

Ensayo de detección directa de cOA

Los ensayos de detección de cOA *in vitro* se llevaron a cabo en un amortiguador de ensayo de actividad de TtCmr (20 mM de Tris-HC pH 8.0, 150 mM de NaCl, 10 mM de DTT, 1 mM de ATP y 0.5 mM de MgCl₂) al cual se le añadió el complejo Cmr40 o Cmr46 (62.5 nM), así como los sustratos de ARN (200 nM, enlistado en la Tabla 4). La reacción se incubó a 65 °C durante 1 hora, después de lo cual se añadieron 0.05 unidades de pirofosfatasa (ThermoFisher EF0221), seguido de una incubación a 25 °C durante 30 minutos. La señal se visualizó utilizando el kit de ensayo de fosfato verde de malaquita de Sigma-Aldrich (MAK307).

Ensayo de desplazamiento de la movilidad electroforética (EMSA)

Los EMSAs se realizaron incubando 400 nM de complejo TtCmr endógeno con ARNs diana etiquetados (Tabla 4) en amortiguador de unión de Cmr (20 mM de Tris-HCl pH 8.0, 150 mM de NaCl). Todas las reacciones se incubaron durante una hora a 65 °C una hora antes de la electroforesis en un gel de poliacrilamida nativo al 5 % (p/v) (PAGE) durante 2.5 horas a 15 mA o durante la noche a una constante de 4 mA. La imagen se visualizó mediante imagenología de fósforo.

Resultados

Actividad de escisión de ARN de complejos TtCmr de diferentes tamaños.

Nuestros estudios previos mostraron que los complejos Cmr nativos purificados a partir de HB8 de *T. thermophilus* estaban cargados con una gama de guías de ARNcr maduro de diferentes longitudes, y que el ARNcr-4.5 (arreglo 4, espaciador 5 de CRISPR de *T. thermophilus*) era el más abundante. (Staals et al., 2013. Mol. Cell 52: 135-145). El complejo Cmr endógeno escinde específicamente ARNs diana etiquetados en 5' complementarios (ARN diana 4.5) a intervalos de 6 nt, lo que da como resultado fragmentos de degradación etiquetados en 5' de principalmente 21, 27, 33 y 39 nucleótidos (Figura 3A). Sin embargo, la naturaleza heterogénea del contenido de ARNcr de los complejos Cmr endógenos (Staals et al., 2013. *Ibid*, Taylor et al., 2015. Science 348: 581-586) complica la interpretación de estos resultados. Por lo tanto, para sondear adicionalmente el mecanismo de escisión del ARN diana, reemplazamos el complejo Cmr endógeno con un complejo Cmr reconstituido unido a un único ARNcr (ARNcr-4.5) de diferentes longitudes.

Tabla 4. Oligonucleótidos (ARNs diana) utilizados en este estudio

Nombre del oligo	Secuencia (5' a 3')	Comentarios
P1	AUUGCGACCCGUAGAUAAAGGGCCUUGGGAGGACCCACCG <u>UCAAGGCCAGUUGC</u>	ARNcr 4.5, 46 nts (secuencia espaciadora subrayada)
P2	AUUGCGACCCGUAGAUAAAGGGCCUUGGGAGGACCCACCG <u>UCAAGGCCAGUUGC</u>	ARNcr 4.5, 34 nts (secuencia espaciadora subrayada)
P3	AUUGCGACCCGUAGAUAAAGGGCCUUGGGAGGACCCACCG <u>UC</u>	ARNcr 4.5, 40 nts (secuencia espaciadora subrayada)
P4	AUUGCGACCCGUAGAUAAAGGGCCUUGGGAGGACCCACCG <u>UCAAGGCC</u>	ARNcr 4.5, 46 nts (secuencia espaciadora subrayada)
P5	GAACUUGCCUUGACCGUUGGUGUCCUCCCGGGCCUUA <u>UCUACGGCCAUUG</u>	ARN 1 diana (parte subrayada complementaria a ARNcr 4.5)
P6	GUUGUGCCUUGACCGUUGGUGUCCUCCCGGGCCUUA <u>UCUACGGCCUUG</u>	ARN diana coincidente -3/-1 (parte subrayada)
P7	GUUGUGCCUUGACCGUUGGUGUCCUCCCGGGCCUUA <u>UCUACGGCCUUG</u>	ARN diana coincidente -4/-2 (parte subrayada)
P8	GUUGUGCCUUGACCGUUGGUGUCCUCCCGGGCCUUA <u>UCUACGGCCAUUG</u>	ARN diana coincidente -5/-3 (parte subrayada)
P9	GAACUUGCCUUGACCGUUGGUGUCCUCCCGGGCCUUA <u>UCUACGGCCAUUG</u>	ARN diana no coincidente +1 (parte subrayada)
P10	GAACUUGCCUUGACCGUUGGUGUCCUCCCGGGCCUUA <u>UCUACGGCCAUUG</u>	ARN diana no coincidente +2 (parte subrayada)
P11	GAACUUGCCUUGACCGUUGGUGUCCUCCCGGGCCUUA <u>UCUACGGCCAUUG</u>	ARN diana no coincidente +3 (parte subrayada)

P12	GAACUGGGCCUUUGACCGUGGUGGUGGGGGGGGGGGUUUA UCUUCGGGGCCAUCC	ARN diana no coincidente +4 (parte subrayada)
P13	GAACUGGGCCUUUGACCGUGGUGGUGGGGGGGGGGGUUUA UCAACGGGGCCAUCC	ARN diana no coincidente +5 (parte subrayada)
P14	GAACUGGGCCUUUGACCGUGGUGGUGGGGGGGGGGGUUUA UCUACGGGGCCAUCC	ARN diana no coincidente +6 (parte subrayada)
P15	GAACUGGGCCUUUGACCGUGGUGGUGGGGGGGGGGGUUUA ACUACGGGGCCAUCC	ARN diana no coincidente +7 (parte subrayada)
P16	GAACUGGGCCUUUGACCGUGGUGGUGGGGGGGGGGGUUUA UCAUGGGGGCCAUCC	ARN diana no coincidente +1-5 (parte subrayada)
P17	GAACUGGGCCUUUGACCGUGGUGGUGGGGGGGGGGGAAU ACUACGGGGCCAUCC	ARN diana no coincidente +7-11 (parte subrayada)
P18	GAACUGGGCCUUUGACCGUGGUGGUGGGGGGGGGGGUUUA UCUACGGGGCCAUCC	ARN diana no coincidente +13-17 (parte subrayada)
P19	GAACUGGGCCUUUGACCGUGGUGGUGGGGGGGGGGGUUUA UCUACGGGGCCAUCC	ARN diana no coincidente +19-23 (parte subrayada)
P20	GAACUGGGCCUUUGACCGUGGUGGUGGGGGGGGGGGUUUA CUACGGGGCCAUCC	ARN diana no coincidente +25-29 (parte subrayada)
P21	GAACUGGGCCAAUUGACCGUGGUGGUGGGGGGGGGGGUUUA UCUACGGGGCCAUCC	ARN diana no coincidente +13-35 (parte subrayada)
P22	CUUAUCUACGG	ARN diana de 1-11 pares de bases
P23	GGGGCCUUUAU	ARN diana de 7-17 pares de bases
P24	GUCCCCGGGGG	ARN diana de 13-23 pares de bases
P25	GUGGUCCGUCCC	ARN diana de 19-29 pares de bases
P26	CUUCACCCUGGU	ARN diana de 25-35 pares de bases

P27	GAAUUGGGCCUUGACGUGGUGGUGCCCGGGCCUUA UCUACGGCCAUCC	ARN 2 diana (parte subrayada complementaria a ARNcr 4.5)
P28	GUUGGGCCUUGACGUGGUGGUGCCCGGGCCUUA UCUACGGCCAGCGU	ARN diana no coincidente +11 (parte subrayada)
P29	GUUGGGCCUUGACGUGGUGGUGCCCGGGCCUUA UCUACGGCCAGCGU	ARN diana no coincidente +17 (parte subrayada)
P30	GUUGGGCCUUGACGUGGUGGUGCCCGGGCCUUA UCUACGGCCAGCGU	ARN diana no coincidente +23 (parte subrayada)
P31	GUUGGGCCUUGACGUGGUGGUGCCCGGGCCUUA UCUACGGCCAGCGU	ARN diana no coincidente +29 (parte subrayada)
P32	GUUGGGCCUUGACGUGGUGGUGCCCGGGCCUUA UCUACGGCCAGCGU	ARN diana no coincidente +35 (parte subrayada)

Elegimos incluir longitudes de ARNcr de 34 (TtCmr-34), 40 (TtCmr-40) y 46 nt (TtCmr-46) en función de su abundancia en nuestros datos de secuenciación de ARN previos (Staals et al., 2013. *Ibid*). A diferencia de la mezcla de productos de degradación etiquetados en 5' observada con el complejo endógeno, cada uno de los complejos reconstituidos produjo productos de degradación definidos de un solo tamaño en su mayoría (Figura 3B). Esto es consistente con la idea de que la longitud del complejo está determinada por la longitud del ARNcr, con complejos más grandes (por ejemplo, TtCmr-46) se escinden más cerca del extremo 5' (etiquetado) del ARN diana. Los complejos más pequeños (es decir, TtCmr-40 y TtCmr-34) carecen de uno o dos segmentos de la estructura principal de Cas7-Cas11 (Cmr4-Cmr5) respectivamente y, por lo tanto, escinden el ARN diana en ubicaciones más distales (más alejadas de la etiqueta 5'), lo que da como resultado productos de degradación más grandes. Estos resultados muestran que la población de complejos endógenos de TtCmr es una mezcla heterogénea de complejos más grandes y más pequeños, que escinden sus ARNs diana cognados en diferentes posiciones.

La secuencia semilla de TtCmr

Para investigar la importancia de estos complejos Tipo III con diferentes estequiometrías, configuramos ensayos de actividad para sondear las diferencias en los requisitos de direccionamiento y semilla. En los complejos efectores tipo I estructuralmente similares (es decir, el complejo Cascade), el direccionamiento está gobernado por dos factores: el PAM (motivo adyacente al protoespaciador) y la semilla (Mojica et al., 2009. *Microbiol* 155: 733-740; Semenova et al., 2011. *Proc Natl Acad Sci US A* 108: 10098-10103; Wiedenheft et al., 2011. *Proc Natl Acad Sci U S A* 108: 10092-10097). Sin embargo, en los sistemas tipo III, la auto discriminación es conferida por un llamado rPAM, el cual verifica la complementariedad entre el asa 5' de 8 nt del ARNcr (conocido como nucleótidos -8 a -1) y la región 3' correspondiente que flanquea el protoespaciador [Elmore et al., 2016. *Genes Dev* 2016. 30: 447-459; Kazlauskienė et al., 2016. *Mol Cell* 62: 295-306.; Marraffini and Sontheimer, 2010. *Nature* 463: 568-571]. En caso de la complementariedad, la actividad de la ADNasa de Cas10 se elimina. Dado que TtCmr carece de la actividad de ADNasa (Staals et al., 2013. *Ibid*), debido a una proteína Cas10 trunca en el N terminal que carece del dominio HD (datos no mostrados), probamos si la actividad de la ARNasa se ve afectada por ARNs diana con coincidencias con el asa 5' del ARNcr. Sin embargo, los ensayos de actividad mostraron que estos sustratos no tenían un efecto discernible en la actividad de escisión del ARN, lo que sugiere que el direccionamiento del ARN por TtCmr no verifica el direccionamiento de ARNs propios (por ejemplo, transcripciones antisentido del arreglo de CRISPR), similar a otros sistemas tipo III (Tamulaitis et al., 2014. *Mol Cell* 56: 506-517; Samai et al., 2015. *Cell* 161: 1164-1174).

A continuación, probamos si TtCmr utiliza una semilla similar a los sistemas tipo I mediante la configuración de ensayos de actividad con mutaciones en los primeros 8 nt de la porción guía del ARNcr (el segmento no repetido del apareamiento de bases del ARNcr con el protoespaciador). Los resultados mostraron que el direccionamiento al ARN no se vio afectado por estas mutaciones, aunque una falta de coincidencia en la posición 5 bloqueada abolió el sitio de escisión adyacente, como lo demuestra el producto de degradación de 39 nt faltante (Figura 4A, B). Como se demuestra en la Figura 4A, las mutaciones en los primeros 8 nt de la porción guía del ARNcr no afectan la degradación del ARN diana. Sin embargo, su efecto en la producción de cOA y la posterior degradación no específica del ARN aún estaba por dilucidarse. Se logró una mayor comprensión del efecto de los nucleótidos no coincidentes individuales en la producción de cOA mediante el empleo de un nuevo ensayo.

Para el complejo TtCmr endógeno, así como de los dos complejos Cmr reconstituidos (46 nt y 40 nt, Figura 5), los resultados demuestran claramente la importancia de tener complementariedad en las posiciones de nt 1, 2 y 5 para la producción de cOA (Figura 3). La producción de cOA se ve afectada en menor grado por una falta de coincidencia en la posición de nt 4 en comparación con 1, 2 y 5. Sorprendentemente, la falta de coincidencia en las posiciones de nt 3, 6 y 7 parece tener poco impacto en la producción de la molécula del segundo mensajero.

Estos resultados sugieren que la complementariedad total es innecesaria en esta región y que la semilla podría estar ubicada en una región diferente. De hecho, trabajo anterior sobre el complejo Cmr tipo IIIB de *Sulfolobus islandicus* (Peng et al., 2015. *Nucleic Acids Res* 43: 406-417) mostró requisitos estrictos de apareamiento de bases en el extremo 3' del ARNcr.

Para investigar esta posibilidad, realizamos ensayos de actividad con el complejo TtCmr endógeno y dianas de ARN con diferentes segmentos no coincidentes (Figura 6A). De acuerdo con los hallazgos anteriores, las dianas de ARN sin coincidencias en el primer segmento (nucleótidos 1-5) no interfirieron con la degradación diana, a pesar de omitir un sitio de escisión corriente abajo del segmento no coincidente. Sin embargo, el efecto en la producción de cOA es muy significativo, eliminándolo casi por completo (Figura 6). Para el segundo y tercer segmentos no coincidentes (nucleótidos 7-12 y 13-17), se omitieron tanto los sitios de escisión corriente arriba como corriente abajo, mientras que los otros sitios de escisión no se vieron afectados. El segundo segmento no coincidente abolió por completo la producción de cOA, mientras que todavía se observó una cantidad significativa de producción de cOA en el tercer segmento no coincidente. Sin embargo, cuando se introdujeron faltas de coincidencia en los segmentos cuarto y quinto (nucleótidos 19-23 y 25-29), la degradación del ARN se eliminó por completo, mientras que la producción de cOA solamente se vio afectada en la falta de

coincidencia del cuarto segmento. La falta de coincidencia en el último segmento (nucleótidos 31-35) no tuvo ningún efecto en la degradación del ARN o en la producción de cOA, excepto en la omisión del sitio de escisión corriente arriba. Esto indica que el apareamiento de bases en la región que abarca los segmentos cuarto y quinto es crucial para el reconocimiento y la degradación de la diana, al mismo tiempo que desempeña un papel en el inicio de la producción de cOA. Dado que el complejo endógeno es una mezcla de complejos más largos y más cortos, cambiamos a utilizar los complejos reconstituidos con ARNcr de 46 (TtCmr-46) o 40 nt (TtCmr-40) con la finalidad de identificar esta región crucial con más precisión. El complejo TtCmr-46 mantuvo casi por completo los resultados obtenidos con el complejo endógeno, mostrando la sensibilidad de la degradación del ARN a las faltas de coincidencia dentro del cuarto y quinto segmentos y efectos significativos en la producción de cOA en el primer, segundo y cuarto segmento (Figura 5B). Sin embargo, esta región esencial parecía haberse desplazado 1 segmento en el complejo TtCmr-40, con estrictos requisitos de apareamiento de bases en el tercer y cuarto segmentos (Figura 5A). En conjunto, estos resultados sugieren fuertemente una región semilla ubicada en 3' dentro de TtCmr que, notablemente, se desplaza hacia el extremo 5' de la guía con tamaños de ARNcr (y por lo tanto complejos) más pequeños. Proponemos que estas regiones, juntas o independientemente, actúan como una secuencia semilla en TtCmr.

Planteamos la hipótesis de que esta secuencia semilla es responsable de iniciar la unión durante el reconocimiento de un ARN diana complementario. Por esta razón, probamos la afinidad de unión de las mismas dianas de ARN no coincidentes en un EMSA utilizando el complejo TtCmr endógeno (Figura 6A). De acuerdo con los ensayos de actividad, observamos que las dianas no coincidentes en los primeros tres segmentos (nucleótidos 1-5, 7-11 y 13-17) no interfieren con la unión al complejo TtCmr y migraban de manera similar al control de ARN diana totalmente complementario. Sin embargo, las faltas de coincidencia en el cuarto y quinto segmentos (nucleótidos 19-23 y 25-29) afectaron sustancialmente la migración del complejo terciario TtCmr-ARN diana en el gel. Aunque la migración fue diferente del estado no unido, anticipamos que esto podría representar una unión parcial a las otras partes corriente abajo (complementarias) del ARN diana.

Para establecer adicionalmente que el apareamiento de bases se inicia en el extremo 3' del ARNcr, diseñamos ARNs diana cortos de 11 nt en un EMSA. Mientras que las dianas complementarias a las partes 5' del ARNcr no pudieron aparearse con las bases del ARNcr, las dianas que apareaban bases con la región semilla 3' propuesta pudieron unirse (Figura 6B). Estos resultados indicaron que el extremo 5' de la guía está de alguna manera protegido de las interacciones de apareamiento de bases con su ARN diana cognado. En cambio, la formación del dúplex ARNcr:diana parece iniciarse en el extremo 3' de la guía antes de propagarse hacia el extremo 5'.

Anteriormente, resolvimos las estructuras de crio-EM de complejos TtCmr unidos a dianas de apo y ARNcs de diferentes tamaños (Taylor et al., 2015. Science 348: 581-585). Observamos que el complejo experimenta una reorganización concertada de subunidades tras la unión del ARN diana. Más notablemente, el filamento de Cas11 (Cmr5) gira alejándose del centro del complejo, exponiendo así las partes más ubicadas en 5' del ARNcr en un canal que permite una propagación adicional del dúplex ARNcr:ARN diana.

Estas observaciones concuerdan bien con la región semilla identificada en este estudio. Por ejemplo, la semilla propuesta reside en una región de mayor accesibilidad y tiene interacciones con Cmr1, Cmr6 y un pulgar de Cmr4. También es el primer segmento de ARNcr que está adyacente a un Cmr5 desde la parte superior. Esto sugiere que la unión inicial a la diana podría comenzar en la región "abierta" más accesible de la cabeza de Cmr1; sin embargo, los residuos cruciales de la secuencia semilla son necesarios para iniciar los cambios conformacionales dentro del complejo intercalándose entre las cadenas principales "cerradas" mayores (Cmr4) y menores (Cmr5). Una vez que la región semilla se une, el canal de TtCmr se puede abrir, el resto del sustrato puede formar pares de bases, propagando así los cambios conformacionales concertados.

45 Ejemplo 2

Materiales y métodos

Reconstitución del complejo Cmr46

Primero, se añadieron 3.5 µL de ARNcr (700 ng) a 3.5 µL de amortiguador Cmr1X (20 mM de Tris-HCl pH 8.0, 150 mM de NaCl). Posteriormente, las subunidades se añadieron a la mezcla de reacción en un orden específico (Cmr3, Cmr2, Cmr4, Cmr5, Cmr6, Cmr1) hasta una concentración final de 2.5 µM, 2.5 µM, 10 µM, 7.5 µM, 2.5 M y 2.5 µM, respectivamente, para completar un volumen total de reacción de 20 µL. La mezcla de reacción se incubó a 65 °C durante 30 minutos.

La secuencia de ARN diana utilizada en los ensayos comprende la secuencia:

(GAACUGCGCCUUGA)C(GUGGU)C(GUCCC)C(GGGCG)C(CUUAU)C(UACGGCCAUCG), en la que los nucleótidos subrayados eran nucleótidos de base desoxi. Este ARN diana no puede ser escindido por el complejo Cmr.

Ensayo de detección de Pi

Los ensayos de detección de cOA *in vitro* se llevaron a cabo en un amortiguador de ensayo de actividad de TtCmr (20 mM de Tris-HCl pH 8.0, 150 mM de NaCl, 10 mM de DTT, 1 mM de ATP y 0.5 mM de MgCl₂, 2 unidades de pirofosfatasa inorgánica termoestable (NEB#M0296S)) al cual se le añadió el complejo Cmr (62.5 nM) así como los sustratos de ARN (200 nM a menos que se indique lo contrario). La reacción se incubó a 65 °C durante 1 hora a menos que se indique lo contrario. La señal se visualizó utilizando el kit de ensayo de fosfato verde de malaquita de Sigma-Aldrich (MAK307).

Experimento de la prueba de principio de Csx1

Para el experimento de la prueba de principio de Csx1, el ensayo de detección de cOA se realizó como se describe en "Ensayo de detección de Pi", excepto que después de la incubación durante 1 hora a 65 °C, la muestra se inactivó por calor a 95 °C durante 10 minutos. Después de la inactivación por calor, la muestra se centrifugó a 13.000 g durante 10 min, después de lo cual el sobrenadante se almacenó a -20 °C. A la mezcla de reacción con amortiguador de actividad de TtCmr (20 mM de Tris-HCl pH 8.0, 150 mM de NaCl, 10 mM de DTT, 1 mM de ATP y 0.5 mM de MgCl₂, 2 unidades de pirofosfatasa inorgánica termoestable (NEB#M0296S) y ~1.5 ug de Csx1 (TTHB144), se añadieron 2 uL del sobrenadante adquirido previamente y se incubó a 65 °C durante 10 minutos. Después de la incubación, se añadió el reactivo RNase alert (IDT#11-04-03-03) o DNase alert (IDT#11-04-03-04) de acuerdo con el manual proporcionado. Esta reacción se incubó a 37 °C durante 30 minutos después de medir la fluorescencia.

Resultados

Experimento de sensibilidad

El tiempo de reacción (A) se estableció en 1 h y el tiempo de desarrollo del color en 30 min para explorar la sensibilidad del sistema. Como se muestra en la Figura 8A, se obtuvo una lectura medible (un aumento de ~2 veces sobre fuera de la diana) en el intervalo de 500 pM-1 nM de ARN diana. La estrategia de crear una subunidad mutante que carezca de la capacidad de escindir el ARN diana, para aumentar la sensibilidad efectiva, se emuló utilizando un ARN diana que el complejo no es capaz de escindir.

Experimento de series temporales

El experimento se configuró para determinar la señal medible (indicada en el aumento de veces sobre la muestra en blanco) en puntos de tiempo específicos. El tiempo total de reacción consistió en 2 partes: A) La reacción de producción de Pi tras la adición del ARN diana y B) La reacción colorimétrica después de la adición del reactivo de color. El resultado final fue el aumento de veces, el cual se midió en absorbancia al final de ambos tiempos de reacción combinados. La duración del tiempo total de reacción en la aplicación final se estableció mediante el umbral medible deseado (aumento de veces sobre la muestra en blanco, control negativo). En la Figura 8B, el conjunto de datos se eligió con un tiempo de reacción de color establecido (B) de 15 minutos y un tiempo de reacción de producción de Pi variable (A). Esto se eligió arbitrariamente para dar una idea del sistema.

Experimento mediado por Csx1 de la prueba de principio

Este experimento de la prueba de principio indicado en la Figura 8C se llevó a cabo para probar la activación inducida por el ARN diana de Csx1. Parte de la mezcla de reacción que se incubó en presencia del ARN diana, de modo que se había producido cOA, se añadió a una nueva reacción que contenía Csx1 y secuencias fluoróforas extintoras de ARNcs o ADNcs. Los resultados representados en la gráfica de barras muestran claramente la degradación del ARNcs tras la adición de la mezcla que contiene cOA. Esto indicó que Csx1 se puede activar indirectamente mediante el sistema Cas de CRISPR tipo III tras el reconocimiento del ARN diana.

Ejemplo 3

Materiales y métodos

Proteínas Cas y complejos Cas

Se generó un mutante muerto por escisión D26N de Cmr4 mediante mutagénesis dirigida. Todas las secuencias codificantes de la proteína Cas se generaron como gBlocks (Integrated DNA Technologies (IDT)) sintéticos después de la optimización de codones para la compatibilidad con el hospedero de expresión heterólogo *E. coli*. Todas las secuencias codificantes se clonaron en vectores de expresión utilizando métodos de clonación estándar conocidos por una persona experta en la técnica. Además, se creó un mutante muerto por escisión D26N de Cmr4 mediante mutagénesis dirigida de gBlock de Cmr4. Los vectores de expresión contenían una etiqueta Strep N o C terminal, opcionalmente un sitio de escisión TEV, un elemento de diseño bicistrónico, una secuencia promotora T7, una secuencia terminadora, un origen de replicación de bajo número de copias p15A, y un marcador de resistencia a la kanamicina. El vector de expresión en sí se derivó del vector de clonación p15A (plásmido de Addgene #41187). Todos los vectores de expresión se transformaron en *E. coli* BL21(DE3) para la expresión de proteínas.

ES 2 999 908 T3

Las cepas recombinantes se cultivaron en 2 L de medio Lysogeny Broth (LB), se crecieron hasta que se alcanzó una OD₆₀₀ de ~0.6. El cultivo se colocó en hielo durante 1 hora, después de lo cual se añadió isopropil β-D-1-tiogalactopiranosido a una concentración final de 0.2 mM. El cultivo se incubó posteriormente a 18 °C durante ~16 horas (durante la noche). Las células se cosecharon (5.000 g durante 10 min) y se lisaron en el amortiguador A (100 mM de Tris-HCl, 150 mM de NaCl, pH 8.0) mediante sonicación y, posteriormente, se centrifugaron a 30.000 g durante 45 min. El lisado clarificado se filtró y se corrió sobre una columna FPLC StrepTrap (GE Healthcare, Chicago, IL) pre equilibrada con amortiguador A. Después de lavar la columna con el amortiguador A hasta que no hubo más proteína presente en el flujo no unido, la proteína de interés se eluyó utilizando el amortiguador B (100 mM de Tris-HCl, 150 mM de NaCl y 2.5 mM de D-destiobiotina). Si fue necesario, la proteína se escindió de la etiqueta de afinidad mediante la adición de la proteasa TEV (Genscript Cat. No. Z03030) y se dejó incubar durante la noche a 4 °C. La proteína de interés se separó de la mezcla mediante un paso de cromatografía de afinidad HisTrap, del cual se recolectó el flujo no unido. Si fue necesario, se agregó una cromatografía de exclusión por tamaño adicional para lograr una mayor pureza.

Reconstitución del complejo Cmr46 y del complejo dCmr46

Primero, se agregaron 3.5 µL de ARNcr (700 ng) a 3.5 µL de amortiguador Cmr1X (20 mM de Tris-HCl, pH 8.0, 150 mM de NaCl). Posteriormente, las subunidades se añadieron a la mezcla de reacción en un orden específico (Cmr3, Cmr2, Cmr4 o D26N de Cmr4, Cmr5, Cmr6, Cmr1) hasta una concentración final de 2.5 µM, 2.5 µM, 10 µM, 7.5 µM, 2.5 µM y 2.5 µM, respectivamente, para completar un volumen total de reacción de 20 µL. La mezcla de reacción se incubó a 65 °C durante 30 minutos.

Ensayo de detección indirecta de cOA

Los ensayos de detección de cOA *in vitro* se llevaron a cabo en un amortiguador de ensayo de actividad de TtCmr (20 mM de Tris-HCl pH 8.0, 150 mM de NaCl, 10 mM de DTT, 1 mM de ATP y 0.5 mM de MgCl₂) al que se le añadió complejo Cmr46 reconstituido (62.5 nM), sustratos de ARN en concentraciones variables (enlistados en la Tabla 4 o la Tabla 5), Csx1 (1 uM) y 0.5 uL del sistema RNaseAlert QC (Thermo Scientific, preparado de acuerdo con el manual). La reacción se incubó a 65 °C en un termociclador de qPCR, midiendo la fluorescencia resultante a intervalos de 2 minutos (495/520 nm de excitación/extinción), o mediante incubación a 65 °C en un Genie III (Optigene), midiendo la fluorescencia resultante a intervalos de 15 segundos (495/520 nm de excitación/extinción). Se utilizaron mediciones a concentraciones variables del ARN diana para determinar el intervalo de sensibilidad del sistema.

Resultados

Confirmación de la capacidad de unión del ARN diana para dCmr46 y la posterior activación de Cmr2/Cas10

Se generó un mutante D26N de Cmr4, ya que se planteó la hipótesis de que solo afectaba la capacidad de escisión del complejo, pero no su capacidad de unión ni la posterior activación de la subunidad Cmr2/Cas10. Para demostrarlo, se midió la capacidad de unión a la diana utilizando el método de visualización indirecta de cOA descrito anteriormente. De hecho, la proteína mutada no eliminó la unión a la diana del complejo Tipo IIIB de longitud completa (Cmr46) (Figuras 9, 10).

Además, se encontró que el complejo Tipo IIIB catalíticamente muerto de longitud completa (dCmr46) aumentaba la sensibilidad del ARN diana, en comparación con el complejo Tipo IIIB de tipo silvestre (Figuras 9, 10). Además, la señal resultante del ensayo indica que dCmr46 produjo más cOA en el mismo período de tiempo, en comparación con Cmr46 de tipo silvestre (Figura 11). Nuestro objetivo es explotar estas características de D26N de Cmr4 con fines de diagnóstico, en los que aplicamos esta mutación en ensayos *in vitro* para lograr una mayor sensibilidad a la diana. Esto brinda el beneficio de detectar concentraciones más bajas de material diana en muestras de ensayo o de reducir el nivel requerido de preamplificación para alcanzar el límite de detección.

Tabla 5. Oligos de ARN utilizados durante los ensayos de detección indirecta de cOA

Nombre del oligo	Secuencia (5' a 3')	Comentarios
P33	<u>AUUGCGACCCGUAGAUAGGC</u> <u>GCCCGGGGACGACCACGUCAAGGCG</u>	ARNcr 4.5, 46nts
P34	<u>GAACUGCGCCUUGACGUGGU</u> <u>CGUCCCCGGGCGCCUUAUCUA CGGCCAUCG</u>	ARN diana 1 (38nts subrayados complementarios a ARNcr 4.5). Este ARN también se utilizó como fuera de la diana en los ensayos de norovirus.

P35	<u>AUUGCGACACUUAAGCCUUCA</u> <u>GUUGGAAAAUUUGGUGGGAC UGCUG</u>	ARNcr de norovirus, 46nts
P36	GCAAGUAAUUCUCGCGGGGAA CGCGUUCACCGCCGGAAGAU CAUUAU <u>UUGCAGCAGUCCCACCAAUU</u> <u>UUCCAACUGAAGGCUUAAGUC</u> CUAGCC AGGUCACUAUGUCCCCCAUA	ARN diana del norovirus (38nts subrayados complementarios al ARNcr de norovirus)
P37	CGUAAACGACGGCCAGUGCCA AGCUUACUAUACAACCUACUA CCUCAUCA	ARN fuera de la diana

Ejemplo 4. Sistema Tipo IIIA (Csm) de *Thermus thermophilus*

Materiales y métodos

Ensayo de detección de cOA

- 5 Los ensayos de detección de cOA *in vitro* se llevaron a cabo en amortiguador de ensayo de actividad de TtCmr (20 mM de Tris-HCl pH 8.0, 150 mM de NaCl, 10 mM de DTT, 1 mM de ATP y 0.5 mM de MgCl₂) al que se le añadió complejo de Csm endógeno (~2 µg; Staals et al., 2014. Mol Cell 56: 518-530) así como sustratos de ARN (200 nM, enlistado en la Tabla 4). La reacción se incubó a 65 °C durante 1 hora, después de lo cual se añadieron 0.05 unidades de pirofosfatasa (ThermoFisher EF0221), seguido de una incubación a 25 °C durante 10 30 minutos. La señal se visualizó utilizando el kit de ensayo de fosfato verde de malaquita de Sigma-Aldrich (MAK307). El experimento se llevó a cabo de acuerdo con el diseño indicado en la Tabla 6.

Tabla 6. Esquema de reacción para el ensayo de detección directa de cOA utilizando el complejo RNP de Csm Tipo IIIA endógeno. Las reacciones A a D se configuran de acuerdo con la composición presentada.

	A	B	C	D
Complejo Csm	+	+	+	+
ARN diana	-	-	+	+
Pirofosfatasa	-	+	-	+

15 Resultados

La Figura 12 muestra los resultados del ensayo de producción de cOA de Csm Tipo IIIa. Este complejo CRISPR/Cas Tipo III también muestra la producción de cOA después de la adición de un ARN diana complementario.

Ejemplo 5. Detección de SARS-CoV-2 en un recipiente

20 Materiales y métodos

Diseño de ARNcr de Cmr Tipo IIIB y cebadores de RPA

De acuerdo con los reportes de la Organización Mundial de la Salud (OMS) y los Centros para el Control y la Prevención de Enfermedades (CDC), el gen N se identificó como una diana adecuada para la detección de SARS-CoV-2. Se diseñó un ARNcr para una región del gen N, denominada N3 por la CDC, la cual se conserva 25 en múltiples coronavirus tipo SARS-CoV-2:

crRNA_N3:

5' AUUGCGACGCAGCATTGTTAGCAGGATTGCGGGTGCCAATGTGATC 3'

30 Para amplificar la región N3, se diseñaron cebadores de ADN para RPA de acuerdo con los parámetros propuestos por el kit TwistAmp Liquid Basic (TwistDx Ltd, Maidenhead, UK). Además, se agregó una secuencia promotora T7 al extremo 5' del cebador delantero para la transcripción *in vitro*. Al cribar múltiples candidatos para una amplificación exitosa, identificamos el par de cebadores con mejor desempeño:

nCOV_N3_RPA_F1:

5' GGCATAATACGACTCACTATAGGGTCTGATAATGGACCCCAAATCAGCGAAAT 3'

nCOV_N3_RPA_R1:

5' CTCCATTCTGGTTACTGCCAGTTGAATCTG 3'

- 5 El complejo Cmr46 se reconstituyó como se describió anteriormente utilizando crRNA_N3.

El ensayo de detección del SARS-CoV-2 combina la detección de RPA y Cmr Tipo IIIB en una única reacción. Se utilizó el genoma sintético del SARS-CoV-2 como ARN diana. Twist Biosciences (South San Francisco, CA) proporcionó este genoma en forma de seis fragmentos de ARN de 5 kb no superpuestos a aproximadamente 10⁶ copias por microlitro. El genoma de referencia se creó a partir del aislado Wuhan-Hu-1 (GenBank ID: MN908947.3).

El kit TwistAmp Liquid Basic (TwistDx) proporcionó reactivos para la amplificación por RPA. Para permitir trabajar con pequeños volúmenes de muestra, cada mezcla de reacción de RPA proporcionada por el proveedor se dividió en cuatro partes iguales. Además, se incorporaron cebadores de oligonucleótidos, componentes para la transcriptasa reversa y transcripción *in vitro* de T7 en estas mezclas: 1.5 µL de mezcla de cebadores (10 mM; Integrated DNA Technologies), 0.5 µL de M-MLV RT (100 U/µL; Invitrogen), 0.5 µL de DTT (50 mM; Invitrogen), 0.25 µL de inhibidor de ARNasa murina (40 U/µL; New England Biolabs (NEB)), 0.5 µL de polimerasa T7 (50 U/µL; NEB), 2.25 µL de mezcla de solución de dNTP (10 mM; NEB) y 2.25 µL de mezcla de solución de NTP (20 mM; NEB). Junto con la mezcla de RPA, se creó una mezcla de Cmr de SARS-CoV-2 mediante la combinación de 0.125 µL del sistema RNaseAlert QC (Thermo Scientific, pella seca proporcionada por el fabricante resuspendida en 100 µL en lugar de 1 mL), 1 µL de Csx1 (10 µM), complejo Cmr46 a una concentración final de la mezcla de reacción de ~60 nM y ATP a una concentración final de la mezcla de reacción de 1 mM. Después de mezclar ambas soluciones de reacción, se combinaron 16.5 µL de mezcla de RPA con 4.25 µL de mezcla de Cmr de SARS-CoV-2 y 1 µL del templado del genoma sintético de SARS-CoV-2. Se crearon mezclas múltiples que contenían el templado del genoma en un intervalo de 100,000 copias/µL a 10 copias/µL. Las reacciones se incubaron a 37 °C durante 30 minutos y a 65 °C durante 45 minutos en un Genie III (OptiGene). El instrumento realizó la lectura de fluorescencia a partir de los 30 minutos en adelante a 495/520 nm (excitación/emisión).

Resultados

El ensayo de detección de SARS-CoV-2 combina la amplificación del material genético diana con la detección en una sola reacción. Esta mezcla de reacción en un recipiente se incubó a 37 °C durante 45 minutos (pre amplificación), después de lo cual se aumentó la temperatura a 65 °C (producción de señal). En la Figura 13, se muestran los datos del período de incubación del genoma sintético del SARS-CoV-2. Los resultados muestran que, a los pocos minutos de incubación a 65 °C, la señal aumenta significativamente en comparación con el control negativo (NC). Se estima que el tiempo de pre amplificación se puede reducir aún más, dado que la producción de señal generalmente ya se puede observar después de 5 minutos de incubación a 65 °C.

Ejemplo 6. Validación de la detección de SARS-CoV-2 en un recipiente

Materiales y métodos

En colaboración con Wageningen Bioveterinary Research (WBVR), se realizó un ensayo a pequeña escala para validar el ensayo de detección Tipo III en un recipiente para SARS-CoV-2 en muestras de visones. La extracción de ARN se realizó en muestras de hisopado rectal de 4 visones positivos para COVID (IDs de GenBank MT396266, MT457390 y MT457399) utilizando un kit miniprep de ARN Direct Zol (Zymo Research). La muestra se eluyó en 100 µL de agua libre de ARNasa, de los cuales 5 µL se utilizaron como templado para el ensayo de detección. El kit TwistAmp™ nfo (TwistDx) proporcionó reactivos para la amplificación por RPA. Para permitir trabajar con pequeños volúmenes de muestra, cada mezcla de reacción de RPA como es proporcionada por el proveedor se dividió en cuatro partes iguales. El amortiguador de rehidratación sin cebador proporcionado se combinó con 1.05 µL de mezcla de cebadores por reacción (5 mM de delantero y reverso; Integrated DNA Technologies) y, posteriormente, se utilizó para rehidratar las pellas de RPA provistas. Además, se creó una mezcla de Cmr Tipo IIIB combinando 4.5 µL de complejo Cmr46 reconstituido (a una concentración final de la mezcla de reacción de ~60 nM, cargada con ARNcr del gen N3), 0.125 µL del sistema de RNaseAlert QC (Thermo Scientific, pella seca como es proporcionada por el fabricante resuspendida en 100 µL en lugar de 1 mL), 0.25 µL de ATP (80 mM; Sigma Aldrich), 1 µL de Csx1 (10 µM), 0.5 µL de M-MLV RT (100 U/µL; Invitrogen), 0.5 µL de DTT (50 mM; Invitrogen), 0.25 µL de inhibidor de ARNasa murina (40 U/µL; New England Biolabs (NEB)), 0.5 µL de polimerasa T7 (50 U/µL; NEB) y 2 µL de mezcla de solución NTP (20 mM; NEB). Para cada reacción de ensayo, se combinaron 8.425 µL de mezcla de RPA con 5.625 µL de mezcla de Cmr, 0.625 µL de MgOAc (280 mM, TwistDx) y 5 µL de templado o MQ libre de ARNasa, hasta un total de 19.675 µL. Como un control positivo, se utilizaron 5 µL de 100 copias/µL de genoma sintético de SARS-CoV-2 (véase el Ejemplo 5). Las mezclas de reacción se incubaron en un espectrofotómetro Genie II (OptiGene) a 37

°C durante 45 minutos y, posteriormente, a 65 °C durante 30 minutos. La recolección de datos se realiza durante el período de incubación a 65 °C, medido para fluorescencia a 495 nm/520 nm (excitación/emisión) con intervalos de 15 segundos.

Resultados

- 5 Desde el primer brote de SARS-CoV-2 en granjas de visones en los Países Bajos a finales de abril de 2020, WBVR ha sido responsable de todas las pruebas de diagnóstico de visones en los Países Bajos. Se proporcionaron muestras de ARN extraídas y posteriormente se utilizaron en ensayos de diagnóstico los cuales combinaron la amplificación del material genético diana con la detección en una sola reacción. Esta mezcla de reacción en un recipiente se incubó a 37 °C durante 45 minutos (pre amplificación), después de lo cual se
- 10 aumentó la temperatura a 65 °C (producción de señal). Los datos del período de incubación de las muestras de SARS-CoV-2 de visón se muestran en la Figura 14. Estos resultados muestran claramente que la detección de SARS-CoV-2 es posible dentro de los 30 minutos de la incubación a 65 °C, lo que demuestra la aplicabilidad de esta tecnología en matrices de muestras complicadas del mundo real.

REIVINDICACIONES

1. Un sistema de detección de ácido ribonucleico basado en repeticiones palindrómicas cortas agrupadas y regularmente interespaciadas (CRISPR) que comprende:
 - a) un complejo efector que comprende una proteína efectora asociada a CRISPR Tipo III (Cas) y al menos un ARN de CRISPR (ARNcr) que se une a una molécula de ácido nucleico diana;
 - b) medios para determinar directa o indirectamente un nivel de oligoadenilato cíclico (cOA), en el que dicha Cas Tipo III es una Cas 7 Tipo III que carece de actividad de escisión.
2. El sistema de detección de acuerdo con la reivindicación 1, en el que la Cas Tipo III es una Cas Tipo IIIB.
3. El sistema de detección de acuerdo con la reivindicación 2, en el que la Cas Tipo IIIB es de un organismo termófilo tal como *Thermus thermophilus*.
4. El sistema de detección de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1-3, en el que dichos medios para determinar directa o indirectamente un nivel de cOA comprenden medios para determinar un nivel de pirofosfato (PPi).
5. El sistema de detección de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1-4, que comprende adicionalmente una pirofosfatasa inorgánica.
6. El sistema de detección de acuerdo con la reivindicación 5, en el que la pirofosfatasa inorgánica procede de un organismo termófilo, tal como *Thermus thermophilus*, permitiendo la detección isotérmica.
7. El sistema de detección de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1-6, que comprende adicionalmente una endorribonucleasa efectora no específica, dependiente de cOA.
8. El sistema de detección de acuerdo con la reivindicación 7, en el que la endorribonucleasa efectora no específica, dependiente de cOA es Csx1.
9. El sistema de detección de acuerdo con la reivindicación 7 u 8, que comprende adicionalmente un sustrato detectable para dicha endorribonucleasa.
10. Un método para determinar la presencia o ausencia de una molécula de ácido nucleico diana en una muestra, que comprende:
 - proporcionar a la muestra un sistema de detección de ácido ribonucleico de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1-9;
 - incubar la muestra bajo condiciones que permitan la unión del ARNcr a su molécula de ácido nucleico diana; y
 - determinar directa o indirectamente un nivel de oligoadenilato cíclico (cOA), mediante el cual un aumento en el nivel de cOA determinado, en comparación con un control, es indicativo de la presencia de dicha molécula diana en dicha muestra.
11. El método de acuerdo con la reivindicación 10, en el que el nivel de cOA se determina mediante la determinación del nivel de pirofosfato, o el nivel de fosfato inorgánico en caso de que esté presente una pirofosfatasa inorgánica en el sistema de detección.
12. El método de acuerdo con la reivindicación 10 u 11, mediante el cual el nivel de pirofosfato o fosfato inorgánico se determina mediante un ensayo basado en colorimetría, fluorimetría, fluorescencia o bioluminiscencia.
13. El método de acuerdo con la reivindicación 10, mediante el cual el nivel de actividad de cOA se determina indirectamente mediante la determinación del nivel de una endorribonucleasa efectora no específica dependiente de cOA, tal como Csx1, mediante la detección de un sustrato detectable para dicha endorribonucleasa efectora empleando el sistema de detección de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 7-9.
14. El método de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 10-13, en el que la muestra se incuba con el sistema de detección de ácido ribonucleico a una temperatura de entre 37 °C y 85 °C, preferiblemente a alrededor de 65 °C.
15. Un dispositivo que comprende el sistema de detección de ácido ribonucleico de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1-9, que comprende preferiblemente sistemas de detección de ácido ribonucleico de arreglo múltiple de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1-9, que tienen diferentes moléculas de ácido nucleico diana.

P123796PC00 Figuras
Figura 1

A thb160 optimizado

ATGGAACACTTGCCTGGCGATGSCCTTGGGTCCSFTCCAAASAATTAATCGGACAGCCCGTCCACACCGTGA
TTTGTATGDEGGGTCACGTTTSTT GAGTGAAGGACGCGCGCGTGCAGCTAAAGCATTEGCGCGTGAAGTAC
GGGCAAAAAACCTTAFTCTCCCGCTCCCGAGGAATGAGGCTGGGCTGGAGCGTITAGCGGGGGCTGGGATF
CCGAACGTTTTGCTTGTTCGFTCCCGGAAGGTAAGATCCGCGTGGGTGGGCGAGCAGGCACITGGGGC
GGCAGTACTATTTACCGAAACGCGCTGAGGAAGTCTTAGGTCCCGTCCGATCTTTATTTCTGGGCTG
AGCTTLAGCACAACTGGAGGACCTCTTAGAAGGCTATTAAGGCTATCTTCTTLAGAAGGCGACTATCTCT
CGCGCGCGGAGCGCTCTGATGGCCCTTTTGGCGGCCCGCAAGAACACACGCGATTTTCCCGCGTTTCTTG
GGCTCCCGCGCTTATAAGTCTTCCCTTGACGCTGACCGGACAGGCTATTTGCTTTACCAAAAAAGCAAG
CGGACCATCTTCCGCTTCTGTTGGGTTACGCGCGCGGATACCTGGCGCGGCGGACTCTTTAAAGGCT
TGGTGGAAAGGCGGCTCATGGGTTCTTAACTACTACCCACCTGGCAGCACTGCCATTTTGGGAAGGGCTTGG
CCCGCGAGGGCTTGAAGCTGCTTAAAGAGGCGCTGGAGGAACCTTGGGGGTTTACTTGGCGAGGAGGCGC
GTCCCGAGCTTGGTCTATCCAGTTTGGCTTATACCTCATTTGGCGAATGGGACCTACTCTTTTGTACGAA
AGCGCTTAGAGGACTTTCCCTCATTAGCGGAAGACCCCGGCTTATTTGGAGAAAGCTCGGATCGGCTGGG
TGGTATATGGGCTCGCTTCTTCCCAAGGTTGGGTTACDACCAGGGCATACTATGCGCTGTTCACCGCG
ATGGCGATCGCATGGGAGAAACTTGGACGGATGGCTTCCCGAGAGGCTCATCGCGCTTTTCBAATGGC
CTTGCATTAGGCTTTTGGCGCGGAGGCTCAAGGACTTGGGAAGCTCATGGTGGAGGCTTAGTATAATGAGG
CGGGGACCATGTITAGGCTTCTTCCACTGACACDAGCCTTAATGGCGGACGCTGCTTTAGCAGATGGCT
TCCGCGAAGCTTATGGCAGCTTTTGGCGCGGAGGCGCGCGCGCTTCTTATCGGAGGCTTGGAGTATG
CAGCAGCTTGGAGCTCTGCAAGAGGCTATGGATCTTGGCGCGCGCGCGGAAAGGCTGGGCTAAAAGAGGTA
ACCAAAAGCTTAAAGCATTTGCTGGGTTGGCTAFTTCCCGGCTAGTGGAGCGAAGGCTTAGGCTTGGCTGG
GGGACGAGAACTGGCCACTGACTCGCGCTTGGTGGCTTACGCCGACTCTTACCGCGCGCGGAGGCTGGCT
AGTCCGCGCGCATACGAGTGTGTTAGCAGCTGGGCTGGGAAAGCTGGCGAGGCTTGTGAGGGAAGCCCTGG
AGCTGAGGCTTACGATCTTGGCTCGCAAAGAAATGAAAGCTGCTTACCGTGAAGGCTGGAAAGCCCTGG
TGGCGACTGGCGAAGATCTTGGCTGGCGCTGGCAGAGGAAATTAATCTTGGCTGGCGCTTTCGAGAGGCGCTG
GACCAAGCTGGCTTCCCGCTCGAGAGTCTTGAAGTGTGGGACGCGCATLAA

B thb161 optimizado

ATGCTCATCGAGCCCTCGCATCCGCTGATTTGGCGSACGGACGCGCCCTTFACTAACAGTCTTGGTGGCG
CCGGAATTCGTTACCATTTCGCGTSCCGCAGACATGGCTGGTGGCTTACCGTACCCTGCGCGCGCTTTTGG
AGGGGTTGCCACTTCCGGAAGCTGCGGAGGAGGCTCTACGCTGGGCTTCTGCTGGCCCGCTGTGGCCGAA
GAGGGTGAAGGGGGTTGGGCTCTGTTAGCACCTGGCCCTTGGATGCCCTGAAAGCTTGGCGAGGCACGTGA
TCCCTTGGSCCTCTTTGAGTTGCCGCAAGGTTGCGGTTACCAACTGCCCGAGGGGTTATCTCCGTTGGCC
TGGCAAGCCCGGCTTAAAGAAAAGCCGCGCGCTTGGCGGCTATTTGGTACTGGGCTCTTTCCTTGGAG
TGGTTGCTTCAAGATGCCCTGCGAGGTTTGGCGCGCTGGTGCACATGAAGGCTCTGCTGGCTGAGACAGTAC
ACATGCTCCACTTGAACCCAGCAGCACAAACGCGCGCTGAGGGAATCTTATTCCAAACATCGGGCTTGAAT
TTGTTCTGTGAGCGCGCTCTCTTGGCTCTGGTGTGTTGGCGCGGAGGCGCGGAGCCAGAAAGGATTTCCCA
CTTGGTGGAGAACCGGCTTAGCTTTTGGCAAAAAGGGGGCCCGGGGTTCTCTTACCGAGGAAAGT
CGTTCCTGCTCTGTTGCTCTGCTCTGCTCTGCTCTGCTCTGCTCTGCTCTGCTCTGCTCTGCTCTGCTCTG
ACCTTCCAAAGGGCTGGCGCTTCCAAAGGCGTACGCTGGTGGCGCGCTCTGAGGCGGCTTACCGGCTG
TCCCGATGGAATTTGAAGAAAGGTAACCCGAAACCTTCCCGTCCCGCGCTGCTTGGGAGCGTGTACTT

Figura 1 continuación

CGTCCCTCTTCCGCAAGCCCTGGGGTGAAGGAGAGGTACGGTGAAGTGGCCGGAGAAAATCTGGTTCACAAAACC
TTTCCGAGGACGAACAGGATCCCTCGTGAAGGGTTCCGGCTTCCCGCGTEAGGCCCTTGGGATGGGAAAATY
CSTCCCTGGGAAAGAGGCCCTGA

C #hb162 optimizado

ATGAGACCCGCAATTCGCCGAGGCATTCCTCCCCCGCTCCCAAGGAAAGGGTGGTGTCTTGTGGCCCGGSA
TGGCCCTCTCTCTGGCTTGGGAACGATCGTATACCTTTTGGACACCGTGTGTGGCCGAAGTGTGAAAC
CAGCTGAAAGCCAGCCAGTGTCAATGGTGGCCGCAACCCGCACTCCGCGGGCACTTACGTTTCTGGTGGGGT
GCTGTTCGGCCCTGGCCGTGCAGGAGGATCTCTTGAACCCCTTGTGGGAGCTTGAACTCCGCATTTGTTGGTTC
AGCTGGAGAAAGCCGGCCATCACCGCTCTCGGTTGAACTTGAAGTCTTACGTCAGGGCCGAAAAGGTGGSTY
TTGCTCAATACCGCCCTGGCCCTTCAATGGTACCTGGGTTCGCCACTTCTGGCCACAAAGCATGGCCAGCA
GHAAGAAGAGGGGCTAGCCGTTTCTCTTCCGCTGGCCCTTCCCGAGAAAAGTGGSSGAGCTTAATTTCTGGGA
GGAATTTGGAGCCGGCACTTTGGGGCTTGGGAAAACATTTGGGGCCATTTGGTGGCCGTACCCGCGTGGATTCG
CCGCAATTAATACCCGCAAGGGGCTGGTGTTCGCCGGGAAAGAAATTCGGTGAAGAACTTCCCAATATGGA
CAAAAAGCGGGGCTGGCCGGAAGGGTTCGGCACTTGAAGCCAAAAGCTTTGTGGTGTGGTGGCTTTATC
GTGGCCGTGAGCTGGCCGAGGCTATCAGGCTTTTCTCAGGCTTCGCCGGGGGGGAGATCCGCGCAGTCCCG
GTGGCAGCTTACTGGCCGGAACCTGATGGCGTACGTCGCTTGCAGGGGCTCACGCACTTCATCATTTGGCA
CGCCATCCAGTACATAAAATTTCCCGCGCTCATTTGGGGCTGCCAATCATTTTCCATTTCAAAAGACCGTGG
TGTCCCGCCAGAACTACTACCTGGGGCTTAAAGAAGCTGAGCCGCGCCCTCTCCGTTGTATTTGGCCAT
TGGCCGAGGCTCAAAAACCGTCCCTTGGGCGCTCTGGGGGGGGCCGCTTTCCCGGGGCAAAATTTGGT
TTGGAGGAAAAGGATGGTGGTACATGGGATGTGGATCCCTGGTGGACCCCGAAGAGGCCACAAAGATTC
CGEATTTGGTGGGAAAGTGGATCTGTCTTATGCAATTTGTAAAGTCTCTGTAG

D #hb163 optimizado

ATGAGCCATGTCGCATTGTATTTCTTACATGCCCTTACTTCCCTTGCATGCCGGGACTGGCCAAAAGGCACTGG
TGGCAATTTGACTTGGCTATCGCAGGTGAGAAAGCCAACTGGGATTCCTTACTTACCCGGAAGTTCGCTTAAG
GGTGTTCGGCCGACCCCGCCAGTGGCTGGGAGCCGATYACCTTGTTCGCAATATTTGGTCCAGATACCGAG
AAAGCTAGCCAGCAAGCAGGCGCCGTTCCAGGTCCGTGACGCCAAAGTTATTAATTAATTTACCGGTGGGTAT
ATAGGGTGTATTCGCTTTAGTTCGGTCTCCGTACTTGGTGGAGGCTTCCCGCCGAGGCTTTGATGGCTG
GTCTTCAACCGCTGGGGTTCCTGGTTCAGAGATCCACTCGGCTTCTGTGGCACCAGGATCACGCTTA
CTTGGAGATGGGGAGAAAGTGTACTTAGAGGACCTGGACTTAAAAGCCGAGGGGGAGGAAGGATTCGCGC
CTGGGAGGCTTGGCTGGCAGAACCTACTGAGGCGGCGAGTTTGGGACGCTTGGCTGTAGTACATGATGACC
TTATGGGTTTTCTTCTTGAAGACAGCCAGCGAGTACTAGCCGCTATCCGCTTGGACGATGAAACCAAAACA
GTGGCCAAAAGGCGCTTTGTGGTATGAGGAAATCCCTTCCCGCCGAATCGTTGGCTTACCGATTAATCGGTGC
TGAACGCTCGTTCCGCAAGGGCAAGGAAATGCCAAGCAGAGGAGTGTGGGCACTTTTCCGGCTGTCTCTG
AAGAGGCTGGGGTGTGTTCAGCTTGGAGGCAAGGCTACCGTACGGGGTGGCTTGTGTCCATCTGTAGTCC
GGGCTTAG

E #hb164 optimizado

ATGCGCACACCTAAGTCAAGTCTGGGCCAAAAGGGCTATGACAAAGGTACGTCGAAGCTCCCAAGGGAGAGGG
CCGCGGGGAATACCGTGACATGGCCCTGAAATTTGCCCTGTCTTGTGGCTCAGGCGAGGCTCTGTCCAGGCAT
TGGCTTCTGTGATAGTCTTGGCAAGGAGGCCACATAAGGCCCTTGGTAAATGATTTAGCGGAGGCTGTAGGA

Figura 1 continuación

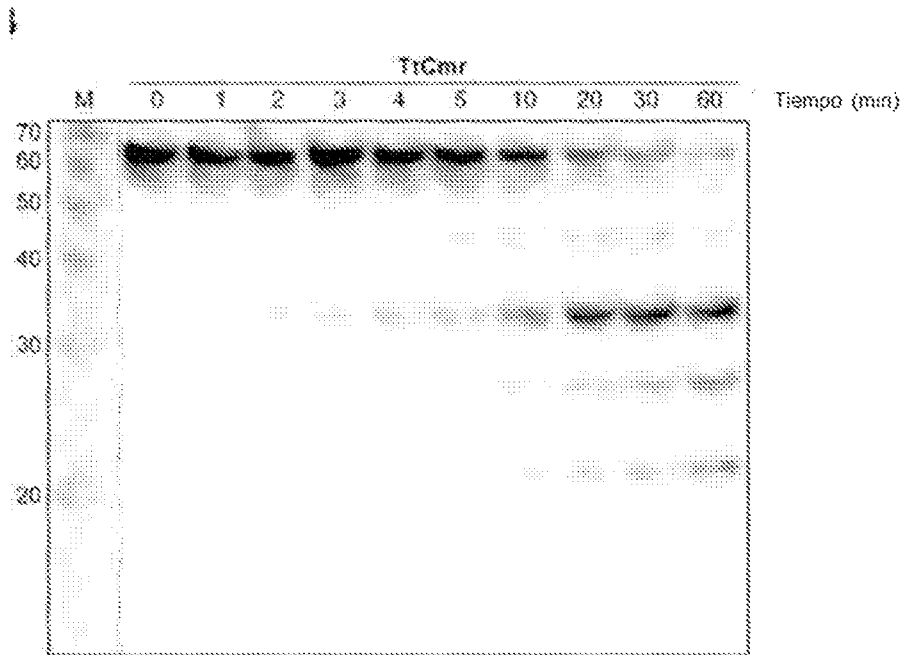
TACCGCGAICTGCGCAATTGGCGGAGGGGGCTCCGTGAAAGCCGAGCTTCTGCAALACCTTCGTTTGACGGC
CGAAGTGCCTTCTGCGCGGAGTGGTTCAAACGTTTCGCCCAAGCGTTGATCGAAGAGTAG

F #b185 optimizado

ATGGGCCGTCGTTCCGCTTGGAGGGAGTACGCTTGGCTCAAGSCAAGGAACCCGCATCGTGGCCTTTGGCT
GGACAAATTCCTACGTTCCGCACGCCCAGGAGALACAGAGGCTAAACCGCTCCTTCTTCCTGAAGCGGGCG
GTATTCGGAGCCCTGGTGAATAAUGCCGCTTCTTCAAGCCTATCGTGGTGGGCTGGAAGCTTTGGGTGCG
GAAATTCGGAGCCCGCCTCTCTTCTGCTTGGTGGTCCGTTT&GGAGCCGAAGGGCTTCTTGAGACTGC
TTTAACCCCTGCATCGTGGCTTATGGGTGSCCTATATTCCTGGCAGCGCACITTAAGGGCTTAGCTAGCCGCT
ACGCTCACTTGEACTTGGAGCCTGAAGCCTGGGCTCCGATCTGGCGCTTTTCAAGCGGGGAGGCGCAG
GCTGGCTTGTTCGGGACAAACGGAGGAACAASSTTGGTTGCTCTTTGGGATGCCCTTCCCTTCCAGGAA
ATGGAGCTGCATCCGATATTCCTAATCCGCATCACCCAGATTACTACGGTCAATTAAGCTCCACCCG
CCGCTGGGACGGTCCCAAACCTGTTCTTCTTGGAGCGCAACCCGGAACGTTCTTATTGGCTTATCTCCA
GCTTCCGCTGTCTCACCGGAGGAAGCCGGCCCAAGCTTGGCCTGCTTGGCGTATCTTAGCTTGGGCCCC
TCGTGAGGAAGGAGTGGGGCAAAAACATCTTCCGGATACGGCGTATGCCATTAGAAGAADCCTGCTETC
AGGGGGAAAAGCCATLGGCCCCAGTCCCTTCCCTGTCCCTGCAAGACTTACTGACTTGGGCTCCCGGTEA
AGTACCGTGAAGTTCGGCTTTTTAGCCAGCCAAAGCGGAGGCGATCTTGGCTTGTGGTGGAGCAAGC
TCAAGCACTTCUCCCGGCACTTGAAGAGCCCGTTCCTTACGTAACCCGCAAGATCTTAAACCTGGCTA
AGGAGCACCCGGGACTTGAGGGGATTAAGCGAAGCTTGGCTTASIGCATAG

Figura 3

A



B

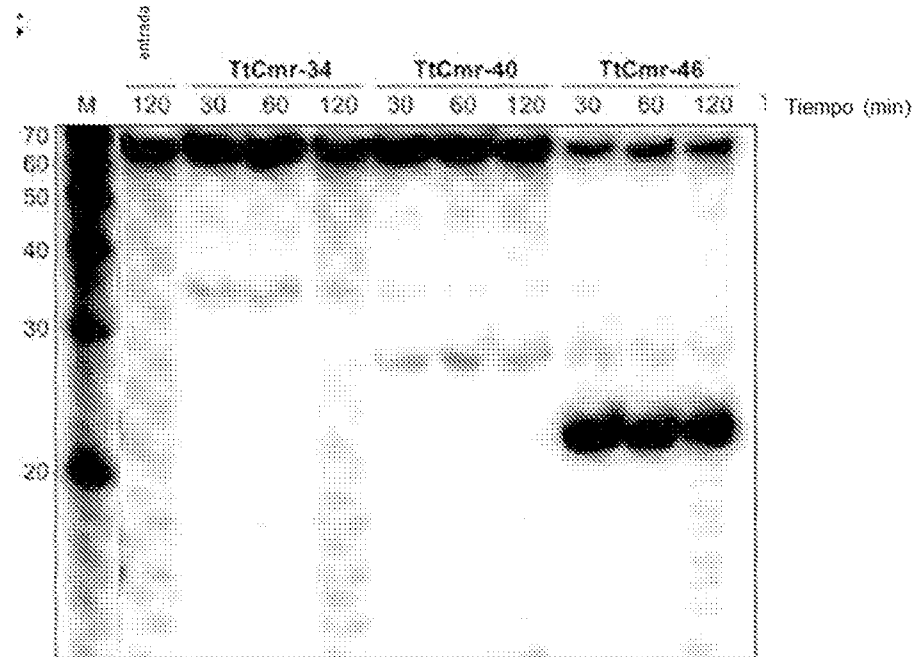
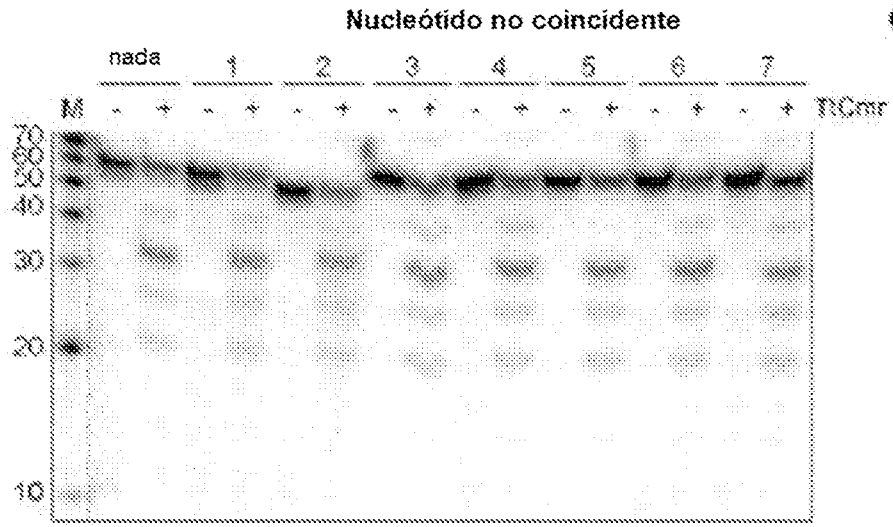


Figura 4

A



B

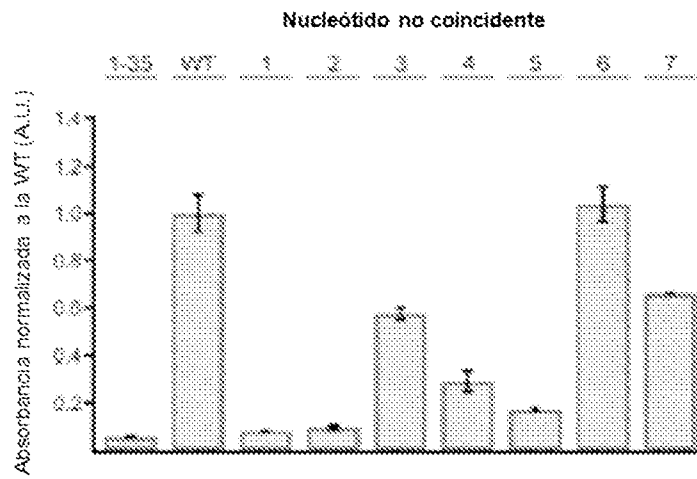


Figura 5

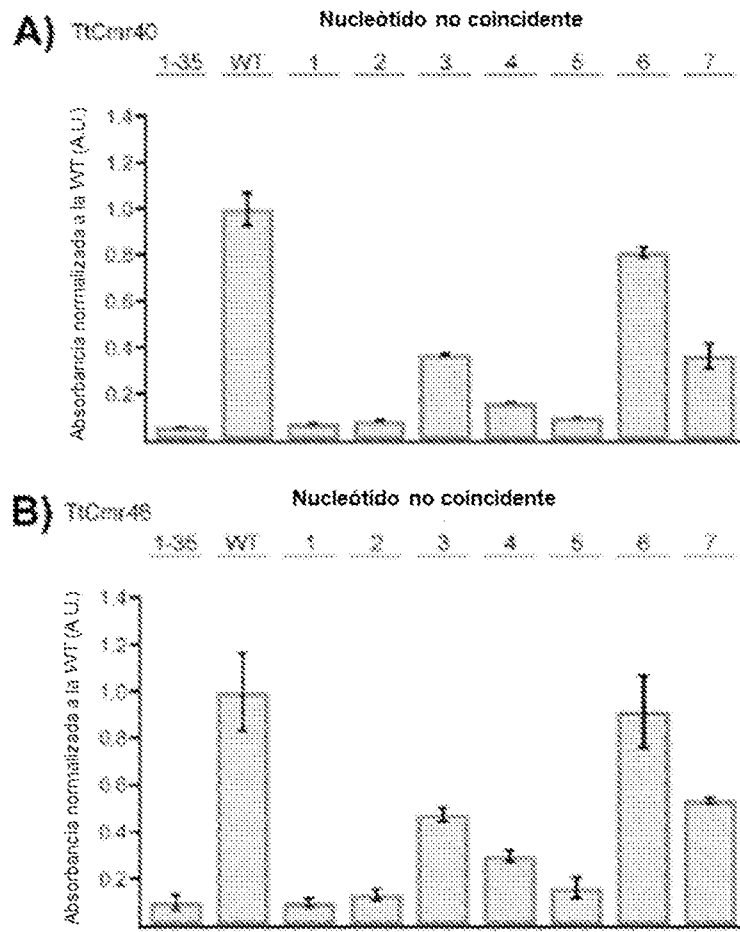


Figura 6

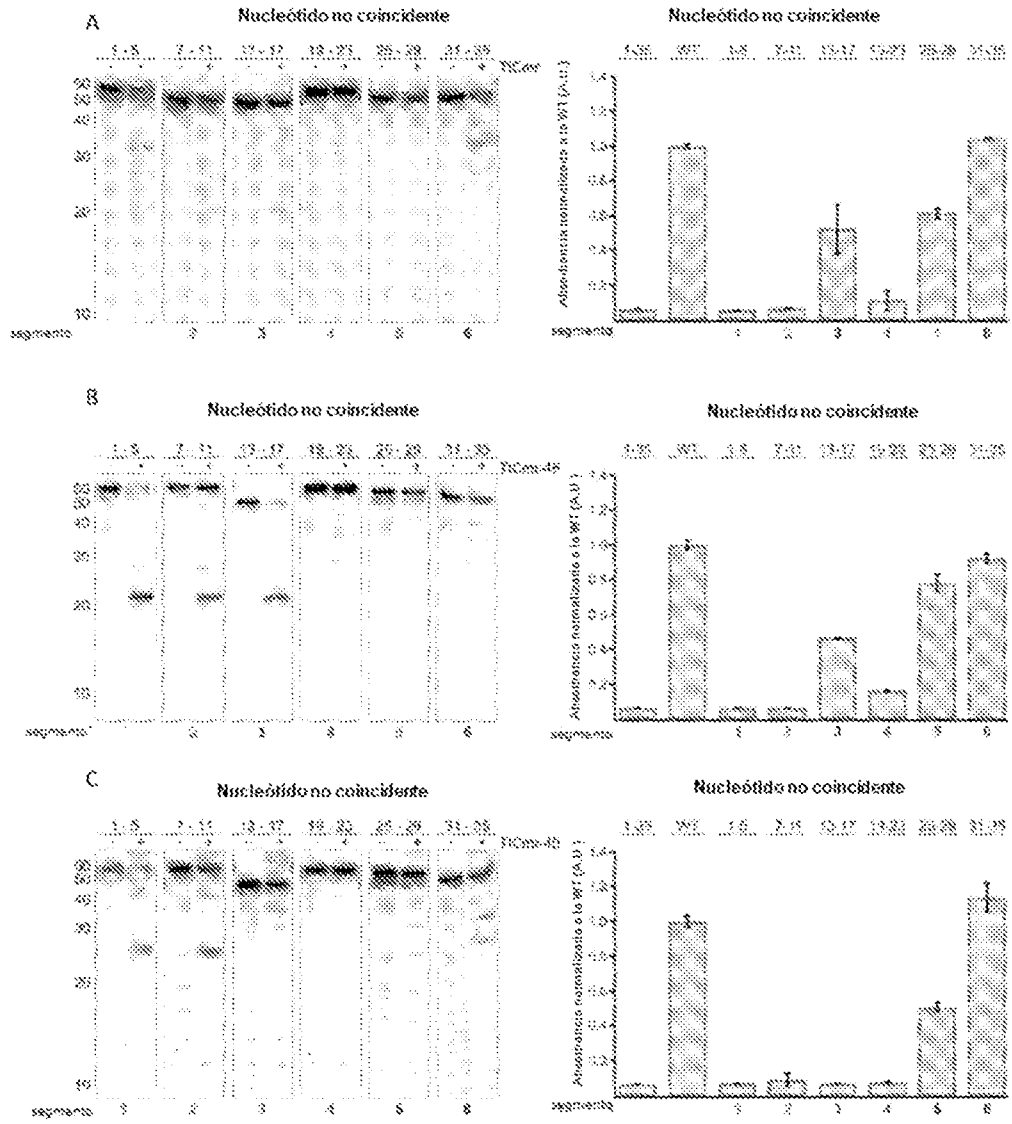


Figura 7

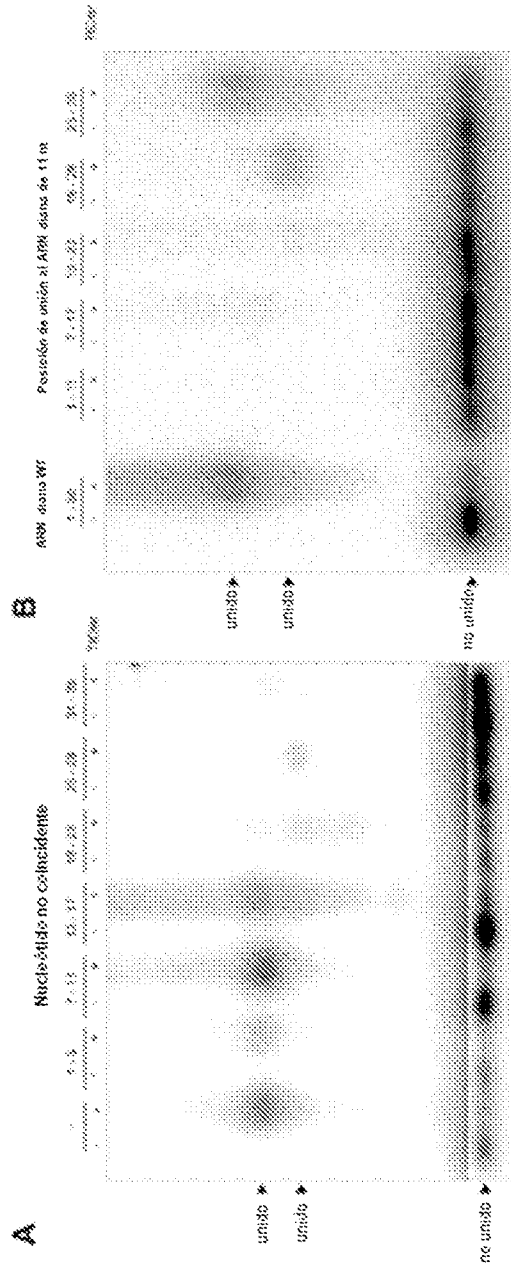


Figura 8

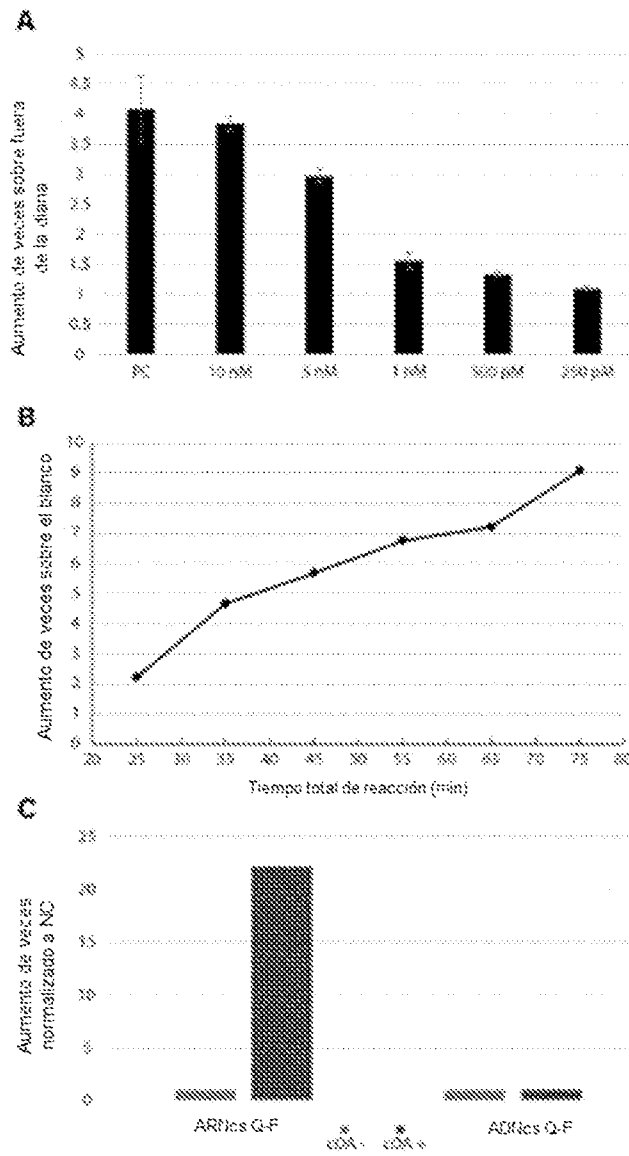


Figura 9

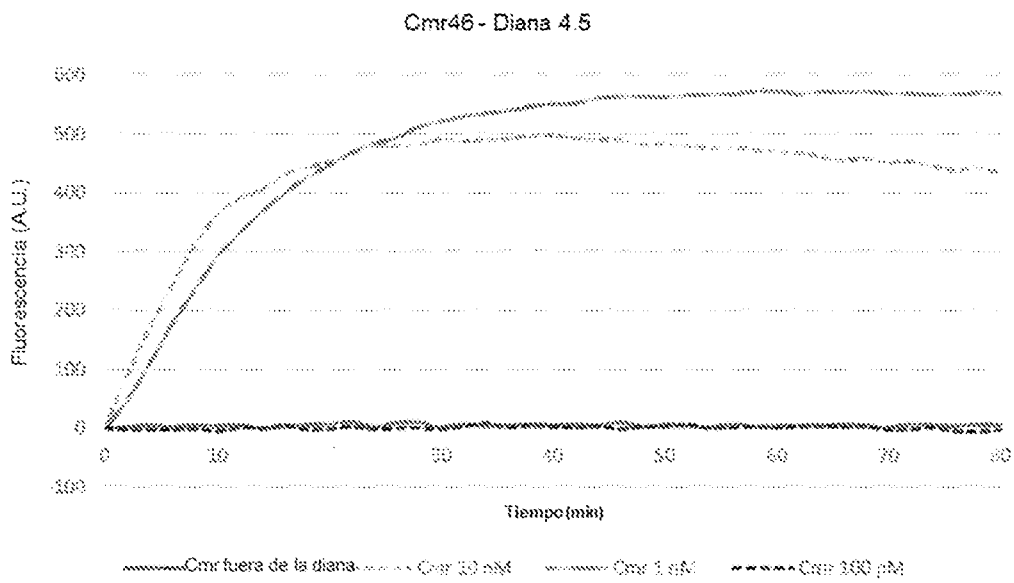


Figura 10

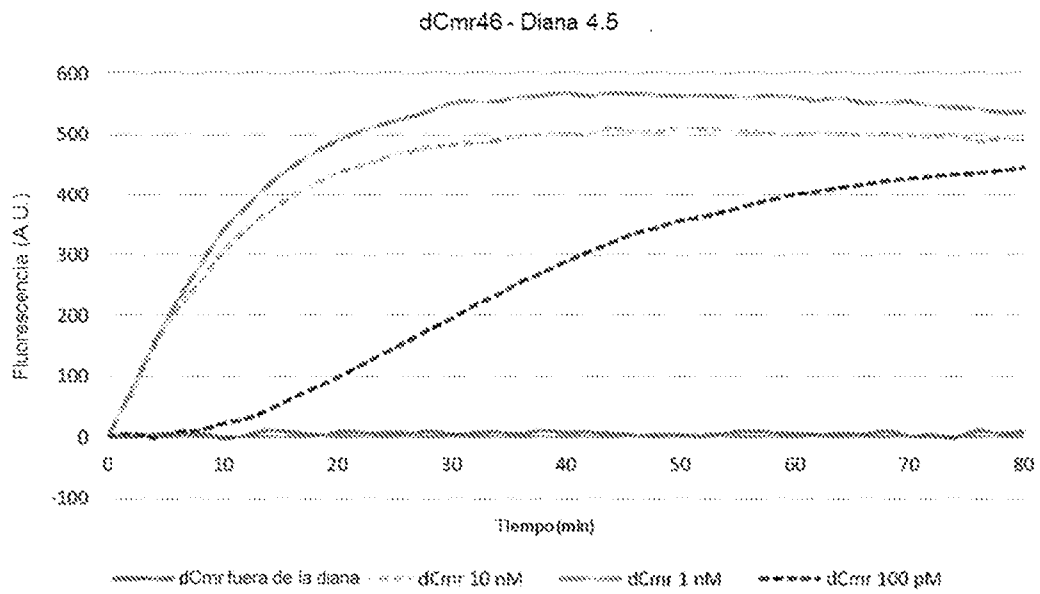


Figura 11

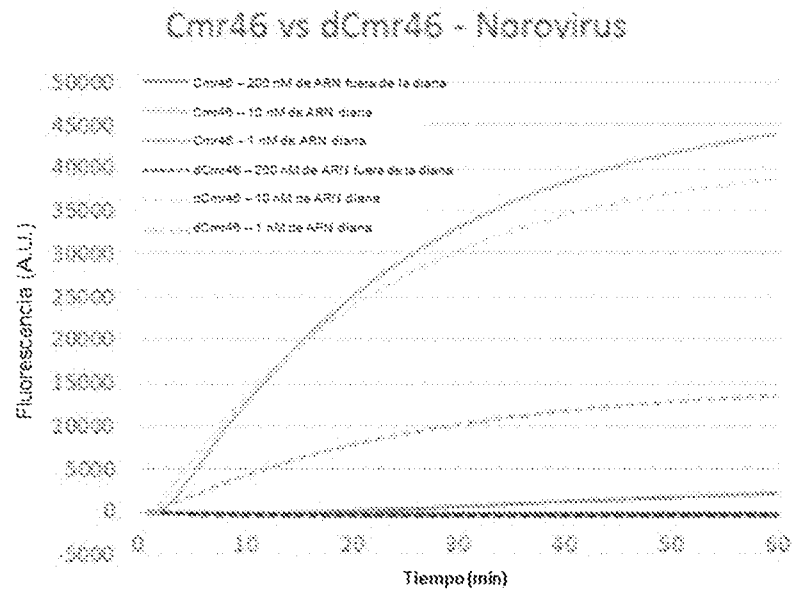


Figura 12

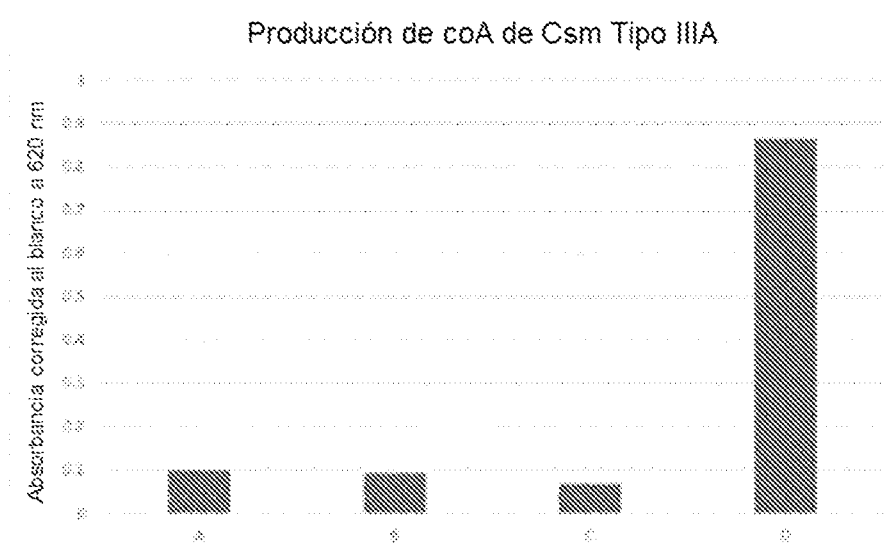


Figura 14

