

(84) 지정국 (별도의 표시가 없는 한, 가능한 모든 종류의 역내 권리의 보호를 위하여): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, ST, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), 유라시아 (AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), 유럽 (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, KM, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

공개:

- 국제조사보고서와 함께 (조약 제21조(3))
- 명세서의 서열목록 부분과 함께 (규칙 5.2(a))

(57) 요약서: 본 명세서에서는 종래 기술의 한계점을 극복하여, CRISPR/Cas12f1 시스템의 세포 내 유전자 편집 활성을 높이기 위한, 엔지니어링 된 Cas12f1 가이드 RNA를 제공한다. 상기 엔지니어링 된 Cas12f1 가이드 RNA는 자연계에서 발견되는 가이드 RNA의 구조 일부를 변형한 것이다. 상기 엔지니어링 된 Cas12f1 가이드 RNA는 그 구성 중 Cas12f1 단백질과 상호작용하는 역할을 하는 스캐폴드 영역의 적어도 일부가 변형된 것을 특징으로 한다. 상기 엔지니어링 된 스캐폴드 영역은 자연계에서 발견되는 가이드 RNA의 스캐폴드 영역과는 다른 것을 특징으로 한다.

명세서

발명의 명칭: CRISPR/CAS12F1 시스템 효율화를 위한 엔지니어링된 가이드 RNA 및 그 용도

기술분야

- [1] [관련출원]
- [2] 본 출원은, 2020년10월 08일자로 출원된 대한민국 특허출원 제10-2020-0129937호 및 2021년 4월 21일자로 출원된 대한민국 특허출원 제10-2021-0051552호에 대한 우선권을 주장하고, 이들 출원 각각의 내용은 그 전체가 참조에 의해 본 명세서에 포함된다.
- [3]
- [4] [기술 분야]
- [5] 본 명세서에서는 CRISPR/Cas 시스템, 특히 CRISPR/Cas12f1 시스템을 유전자 편집에 사용하는 분야에 대한 기술을 개시한다.
- [6]

배경기술

- [7] CRISPR/Cas12f1 시스템은 Class 2, Type V로 분류되는 CRISPR/Cas 시스템이다. 선행연구(Harrington et al., Programmed DNA destruction by miniature CRISPR-Cas14 enzymes, Science 362, 839-842 (2018))에서 최초로 고균 유래의 CRISPR/Cas 시스템인 CRISPR/Cas14a 시스템에 대해 밝혀졌다. 그 후 후속 연구(Karvelis et al., Nucleic Acids Research, Vol. 48, No. 9 5017 (2020))에서 상기 CRISPR/Cas14 시스템을 CRISPR/Cas12f 시스템으로 분류하였다. CRISPR/Cas12f1 시스템은 상기 Class 2, Type V로 분류되는 CRISPR/Cas 시스템 중 하나의 Subtype인 V-F1 시스템에 속하며, 이는 Cas14a를 이펙터 단백질로 가지는 CRISPR/Cas14a 시스템을 포함한다. 상기 CRISPR/Cas12f1 시스템은 CRISPR/Cas9 시스템에 비하여 이펙터 단백질의 크기가 현저히 작다는 특징이 있다. 다만, 선행 연구(Harrington et al., Programmed DNA destruction by miniature CRISPR-Cas14 enzymes, Science 362, 839-842 (2018), US 2020/0190494 A1)에서 밝혀진 바로는, 상기 CRISPR/Cas12f1 시스템, 특히 CRISPR/Cas14a 시스템은 단일가닥 DNA의 절단 능력은 보이나, 이중가닥 DNA에 대해서는 절단 활성이 없거나, 극히 낮아 유전자 편집 기술에 응용하는 데 한계가 있었다.
- [8] 계속된 연구로 최근 선행문헌(Takeda et al., Structure of the miniature type V-F CRISPR-Cas effector enzyme, Molecular Cell 81, 1-13 (2021))에서는 CRISPR/Cas12f1 시스템에서 Cas12f1 단백질이 이량체(dimer)를 형성한다는 사실, 및 가이드 RNA의 구조에 대해 밝혔다. 상기 선행문헌에 의해 가이드 RNA 부분 중 Cas12f1 단백질과 직접적으로 상호작용하지 않는, 이른바 disordered region이 있다는 것이 밝혀졌으며, 또 다른 선행문헌(Xiao et al., Structural basis for

the dimerization-dependent CRISPR-Cas12f nuclease, bioRxiv (2020))에서는 상기 disordered region 부분을 제거하고 in vitro에서 이중가닥 DNA 절단 효율을 살핀 바 있다.

- [9] 하지만, 상기 선행 연구들은 1) 세포 내 유전자 편집 활성(예를 들어, indel 발생 효율)을 보이거나, 이를 높이는 방안에 대한 연구는 아니며, 2) disordered region을 제거한 실험은 있지만, 오히려 절단 활성이 낮아지는 것으로 보고되었으며, 3) 더욱이 상기 실험은 in vitro에서 진행한 실험으로, 세포 내 유전자 편집 활성을 나타내거나, 효율을 높이기 위한 변형이 무엇인지 밝히는데는 실패하였다.

[10]

발명의 상세한 설명

기술적 과제

- [11] 본 명세서에서는 CRISPR/Cas12f1 시스템에 사용되어 유전자 편집 효율을 증가시킬 수 있는 엔지니어링 된 Cas12f1 가이드 RNA를 제공하고자 한다.
- [12] 본 명세서에서는 상기 엔지니어링 된 Cas12f1 가이드 RNA에 포함되어 유전자 편집 효율을 증가시킬 수 있는 엔지니어링 된 스캐폴드 영역을 제공하고자 한다.
- [13] 본 명세서에서는 유전자 편집 효율이 증가된 엔지니어링 된 CRISPR/Cas12f1 복합체를 제공하고자 한다.
- [14] 본 명세서에서는 유전자 편집 효율이 증가된 엔지니어링 된 CRISPR/Cas12f1 시스템을 제공하고자 한다.
- [15] 본 명세서에서는 상기 엔지니어링 된 CRISPR/Cas12f1 시스템의 각 구성요소를 암호화하는 핵산을 가지는 벡터를 제공하고자 한다.
- [16] 본 명세서에서는 상기 엔지니어링 된 CRISPR/Cas12f1 시스템을 사용한 유전자 편집 방법을 제공하고자 한다.
- [17] 본 명세서에서는 상기 엔지니어링 된 CRISPR/Cas12f1 시스템의 용도를 제공하고자 한다.

[18]

과제 해결 수단

- [19] 일 구현예에서, 본 명세서에서는 다음을 포함하는, CRISPR/Cas12f1 시스템을 위한 엔지니어링 된 가이드 RNA를 개시한다:

[20] 엔지니어링 된 스캐폴드 영역; 및

[21] 스페이서;

[22] 이때, 상기 엔지니어링 된 가이드 RNA는 5'말단에서 3'말단 방향으로, 엔지니어링 된 스캐폴드 영역, 및 스페이서가 순서대로 연결되어 있고,

[23] 상기 스페이서는 10개 이상 50개 이하의 뉴클레오타이드를 포함하며, 표적 서열과 상보적인 서열을 가지고,

[24] 상기 엔지니어링 된 스캐폴드 영역의 서열은

5'-CUUCACUGAUAAGUGGAGAACCGCUUCACCAAAGCUGUCCCUUAGG

- GGAUUAGAACUUGAGUGAAGGUGGGCUGCUUGCAUCAGCCUAAUGUCGA
GAAGUGCUUUCUUCGGAAAGUAACCCUCGAAACAAAUUCAUUUGAAAGA
AUGAAGGAAUGCAAC-3'(서열번호 7)과 상이한 것을 특징으로 하며,
- [25] 상기 엔지니어링 된 스캐폴드 영역의 서열은 5'말단에서 3'말단 방향으로 다음
서열이 순서대로 연결된 것임:
- [26] 5'-A-3', 5'-AA-3', 5'-GAA-3', 5'-AGAA-3', 5'-GAGAA-3', 5'-GGAGAA-3',
5'-UGGAGAA-3', 5'-GUGGAGAA-3', 5'-AGUGGAGAA-3',
5'-AAGUGGAGAA-3'(서열번호 16), 5'-AAAGUGGAGAA-3'(서열번호 17),
5'-UAAAGUGGAGAA-3'(서열번호 18), 5'-AUAAGUGGAGAA-3'(서열번호 19),
5'-GAUAAAGUGGAGAA-3'(서열번호 20),
5'-UGAUAAAGUGGAGAA-3'(서열번호 21),
5'-CUGAUAAAGUGGAGAA-3'(서열번호 22),
5'-ACUGAUAAAGUGGAGAA-3'(서열번호 23),
5'-CACUGAUAAAGUGGAGAA-3'(서열번호 24),
5'-UCACUGAUAAAGUGGAGAA-3'(서열번호 25),
5'-UUCACUGAUAAAGUGGAGAA-3'(서열번호 26), 및
5'-CUUCACUGAUAAAGUGGAGAA-3'(서열번호 9)로 이루어진 군에서 선택된
서열;
- [27] 5'-CCGCUUCACUUGAGUGAAGGUGG-3'(서열번호 430),
5'-CCGCUUCACCUUAGGAGUGAAGGUGG-3'(서열번호 431),
5'-CCGCUUCACCAUUGAGUGAAGGUGG-3'(서열번호 38),
5'-CCGCUUCACCAAUAGUUGAGUGAAGGUGG-3'(서열번호 39),
5'-CCGCUUCACCAAAUAGCUUGAGUGAAGGUGG-3'(서열번호 40),
5'-CCGCUUCACCAAAAUAGACUUGAGUGAAGGUGG-3'(서열번호 41),
5'-CCGCUUCACCAAAAGUUAGAACUUGAGUGAAGGUGG-3'(서열번호 42),
5'-CCGCUUCACCAAAAGCUUAGGAACUUGAGUGAAGGUGG-3'(서열번호
43),
5'-CCGCUUCACCAAAAGCUUAGAGAACUUGAGUGAAGGUGG-3'(서열번호
44),
5'-CCGCUUCACCAAAAGCUGUUAGUAGAACUUGAGUGAAGGUGG-3'(서열
번호 45),
5'-CCGCUUCACCAAAAGCUGUUAGUAGAACUUGAGUGAAGGUGG-3'(서열
번호 46),
5'-CCGCUUCACCAAAAGCUGUUUAGAUUAGAACUUGAGUGAAGGUGG-3'(서열
번호 47),
5'-CCGCUUCACCAAAAGCUGUCUUAGGAUUAGAACUUGAGUGAAGGUGG-
3'(서열번호 48),
5'-CCGCUUCACCAAAAGCUGUCCUUAGGGAUUAGAACUUGAGUGAAGGU

- GG-3'(서열번호 49), 및
 5'-CCGCUUCACCAAAAGCUGUCCCUUAGGGGAUUAGAACUUGAGUGAAG
 GUGG-3'(서열번호 10)로 이루어진 군에서 선택된 서열;
- [28] 5'-GCUGCUUGCAUCAGCCUAAUGUCGAGAAGUGCUUUCUUCGGAAAGU
 AACCCUCGA-3'(서열번호 11);
- [29] 5'-AACAAAGAAAGGA-3'(서열번호 110),
 5'-AACAAAUGAAAAGGA-3'(서열번호 111),
 5'-AACAAAUUGAAAAAGGA-3'(서열번호 112),
 5'-AACAAAUUCGAAAGAAGGA-3'(서열번호 113),
 5'-AACAAAUUCAGAAAUGAAGGA-3'(서열번호 114),
 5'-AACAAAUUCAUGAAAAUGAAGGA-3'(서열번호 115),
 5'-AACAAAUUCAUUGAAAAAUGAAGGA-3'(서열번호 116), 및
 5'-AACAAAUUCAUUUGAAAGAAUGAAGGA-3'(서열번호 117)에서 선택된
 서열; 및
- [30] 5'-AUGCAAC-3'.
- [31] 상기 과제를 해결하기 위해, 본 명세서에서는 다음을 포함하는,
 CRISPR/Cas12f1 시스템을 위한 엔지니어링 된 가이드 RNA를 개시한다:
- [32] 엔지니어링 된 스캐폴드 영역; 및
- [33] 스페이서; 및
- [34] 이때, 상기 엔지니어링 된 가이드 RNA는 5'말단에서 3'말단 방향으로,
 엔지니어링 된 스캐폴드 영역, 및 스페이서가 순서대로 연결되어 있고,
- [35] 상기 스페이서는 10개 이상 50개 이하의 뉴클레오타이드를 포함하며, 표적
 서열과 상보적인 서열을 가지고,
- [36] 상기 엔지니어링 된 스캐폴드 영역의 서열은
 5'-CUUCACUGAUAAAGUGGAGAACCGCUUCACCAAAAGCUGUCCCUUAGG
 GGAUUAGAACUUGAGUGAAGGUGGGCUGCUUGCAUCAGCCUAAUGUCGA
 GAAGUGCUUUCUUCGGAAAGUAACCCUCGAAACAAAUUCAUUUUUCCUC
 UCCAAUUCUGCACAAGAAAGUUGCAGAACCCGAAUAGACGAAUGAAGGA
 AUGCAAC-3'(서열번호 315)과 상이한 것을 특징으로 하며,
- [37] 상기 엔지니어링 된 스캐폴드 영역의 서열은 5'말단에서 3'말단 방향으로 다음
 서열이 순서대로 연결된 것임:
- [38] 5'-A-3', 5'-AA-3', 5'-GAA-3', 5'-AGAA-3', 5'-GAGAA-3', 5'-GGAGAA-3',
 5'-UGGAGAA-3', 5'-GUGGAGAA-3', 5'-AGUGGAGAA-3',
 5'-AAGUGGAGAA-3'(서열번호 16), 5'-AAAGUGGAGAA-3'(서열번호 17),
 5'-UAAAGUGGAGAA-3'(서열번호 18), 5'-AUAAAGUGGAGAA-3'(서열번호 19),
 5'-GAUAAAGUGGAGAA-3'(서열번호 20),
 5'-UGAUAAAGUGGAGAA-3'(서열번호 21),
 5'-CUGAUAAAGUGGAGAA-3'(서열번호 22),

5'-ACUGAUAAAGUGGAGAA-3'(서열번호 23),
 5'-CACUGAUAAAGUGGAGAA-3'(서열번호 24),
 5'-UCACUGAUAAAGUGGAGAA-3'(서열번호 25),
 5'-UUCACUGAUAAAGUGGAGAA-3'(서열번호 26), 및
 5'-CUUCACUGAUAAAGUGGAGAA-3'(서열번호 9)로 이루어진 군에서 선택된 서열;

- [39] 5'-CCGCUUCACUUAGAGUGAAGGUGG-3'(서열번호 430),
 5'-CCGCUUCACCUUAGGAGUGAAGGUGG-3'(서열번호 431),
 5'-CCGCUUCACCAUUAGUGAGUGAAGGUGG-3'(서열번호 38),
 5'-CCGCUUCACCAAUUAGUUGAGUGAAGGUGG-3'(서열번호 39),
 5'-CCGCUUCACCAAAUUAGCUUGAGUGAAGGUGG-3'(서열번호 40),
 5'-CCGCUUCACCAAAAUUAGACUUGAGUGAAGGUGG-3'(서열번호 41),
 5'-CCGCUUCACCAAAAGUUAGAACUUGAGUGAAGGUGG-3'(서열번호 42),
 5'-CCGCUUCACCAAAAGCUUAGGAACUUGAGUGAAGGUGG-3'(서열번호 43),
 5'-CCGCUUCACCAAAAGCUUUAGAGAACUUGAGUGAAGGUGG-3'(서열번호 44),
 5'-CCGCUUCACCAAAAGCUGUUAGUUAGAACUUGAGUGAAGGUGG-3'(서열번호 45),
 5'-CCGCUUCACCAAAAGCUGUUAGUAGAACUUGAGUGAAGGUGG-3'(서열번호 46),
 5'-CCGCUUCACCAAAAGCUGUUUAGAUUAGAACUUGAGUGAAGGUGG-3'(서열번호 47),
 5'-CCGCUUCACCAAAAGCUGUCUUAGGAUUAGAACUUGAGUGAAGGUGG-3'(서열번호 48),
 5'-CCGCUUCACCAAAAGCUGUCCUUAGGGAUUAGAACUUGAGUGAAGGUGG-3'(서열번호 49), 및
 5'-CCGCUUCACCAAAAGCUGUCCCUUAGGGGAUUAGAACUUGAGUGAAGGUGG-3'(서열번호 10)로 이루어진 군에서 선택된 서열;

- [40] 5'-GCUGCUUGCAUCAGCCUAAUGUCGAGAAGUGCUUUCUUCGGAAAGUAACCCUCGA-3'(서열번호 11);

- [41] 5'-AACAAAGAAAGGA-3'(서열번호 110),
 5'-AACAAUGAAAAGGA-3'(서열번호 111),
 5'-AACAAAUUGAAAAAGGA-3'(서열번호 112),
 5'-AACAAAUUCGAAAGAAGGA-3'(서열번호 113),
 5'-AACAAAUUCAGAAAUGAAGGA-3'(서열번호 114),
 5'-AACAAAUUCAUGAAAAUGAAGGA-3'(서열번호 115),
 5'-AACAAAUUCAUUGAAAAAUGAAGGA-3'(서열번호 116),

5'-AACAAAUUCAUUUUGAAAGAAUGAAGGA-3'(서열번호 117),
 5'-AACAAAUUCAUUUUGAAACGAAUGAAGGA-3'(서열번호 293),
 5'-AACAAAUUCAUUUUUUGAAAACGAAUGAAGGA-3'(서열번호 294),
 5'-AACAAAUUCAUUUUUUCGAAAGACGAAUGAAGGA-3'(서열번호 295),
 5'-AACAAAUUCAUUUUUUCCGAAAAGACGAAUGAAGGA-3'(서열번호 296),
 5'-AACAAAUUCAUUUUUUCCUGAAAUAGACGAAUGAAGGA-3'(서열번호 297),
 5'-AACAAAUUCAUUUUUUCCUCGAAAUAAGACGAAUGAAGGA-3'(서열번호 298),
 5'-AACAAAUUCAUUUUUUCCUCUGAAAAUAAGACGAAUGAAGGA-3'(서열번호 299),
 5'-AACAAAUUCAUUUUUUCCUCUCGAAAGAAUAGACGAAUGAAGGA-3'(서열번호 300),
 5'-AACAAAUUCAUUUUUUCCUCUCCGAAACGAAUAGACGAAUGAAGGA-3'(서열번호 301),
 5'-AACAAAUUCAUUUUUUCCUCUCCAGAAACCGAAUAGACGAAUGAAGGA-3'(서열번호 302),
 5'-AACAAAUUCAUUUUUUCCUCUCCAAGAAACCCGAAUAGACGAAUGAAGGA-3'(서열번호 303),
 5'-AACAAAUUCAUUUUUUCCUCUCCAUGAAAACCCGAAUAGACGAAUGAAGGA-3'(서열번호 304),
 5'-AACAAAUUCAUUUUUUCCUCUCCAUAUGAAAACCCGAAUAGACGAAUGAAGGA-3'(서열번호 305),
 5'-AACAAAUUCAUUUUUUCCUCUCCAUAUCGAAAGAACCCGAAUAGACGAAUGAAGGA-3'(서열번호 306),
 5'-AACAAAUUCAUUUUUUCCUCUCCAUAUCUGAAAAGAACCCGAAUAGACGAAUGAAGGA-3'(서열번호 307),
 5'-AACAAAUUCAUUUUUUCCUCUCCAUAUCUGGAAACAGAACCCGAAUAGACGAAUGAAGGA-3'(서열번호 308),
 5'-AACAAAUUCAUUUUUUCCUCUCCAUAUCUGCGAAAGCAGAACCCGAAUAGACGAAUGAAGGA-3'(서열번호 309),
 5'-AACAAAUUCAUUUUUUCCUCUCCAUAUCUGCAGAAAUGCAGAACCCGAAUAGACGAAUGAAGGA-3'(서열번호 310),
 5'-AACAAAUUCAUUUUUUCCUCUCCAUAUCUGCACGAAAUGCAGAACCCGAAUAGACGAAUGAAGGA-3'(서열번호 311),
 5'-AACAAAUUCAUUUUUUCCUCUCCAUAUCUGCACAGAAAGUUGCAGAACCCGAAUAGACGAAUGAAGGA-3'(서열번호 312),
 5'-AACAAAUUCAUUUUUUCCUCUCCAUAUCUGCACAGAAAUGCAGAACCC

GAAUAGACGAAUGAAGGA-3'(서열번호 313), 및
 5'-AACAAAUUCAUUUUCCUCUCCAAUUCUGCACAAGAAAGUUGCAGAAC
 CCGAAUAGACGAAUGAAGGA-3'(서열번호 314)로 이루어진 군에서 선택된
 서열; 및

[42] 5'-AUGCAAC-3'.

[43]

[44] 일 구현예로, 본 명세서에서는 다음을 포함하는, CRISPR/Cas12f1 시스템을
 위한 엔지니어링 된 가이드 RNA를 개시한다:

[45] 엔지니어링 된 스캐폴드; 및

[46] 스페이서,

[47] 이때, 상기 엔지니어링 된 가이드 RNA는 5'말단에서 3'말단 방향으로,
 엔지니어링 된 스캐폴드 영역, 및 스페이서가 순서대로 연결되어 있고,

[48] 상기 스페이서는 10 내지 30 뉴클레오타이드 길이를 가지며, 표적 서열과
 상보적인 서열을 가지며,

[49] 상기 엔지니어링 된 스캐폴드 영역의 서열은 5'말단에서 3'말단 방향으로 다음
 서열이 순서대로 연결된 것임:

[50] 5'-A-3'로 표현되는 제1 서열;

[51] 5'-CCGCUUCAC-3'(서열번호 432)로 표현되는 제2 서열;

[52] 5'-UUAG-3'로 표현되는 제3 서열;

[53] 5'-AGUGAAGGUGG-3'(서열번호 433)로 표현되는 제4 서열;

[54] 5'-GCUGCUUGCAUCAGCCUAAUGUCGAGAAGUGCUUUCUUCGGAAAGU
 AACCCUCGA-3'(서열번호 11)로 표현되는 제5 서열;

[55] 5'-AACAAA-3'로 표현되는 제6 서열;

[56] 링커;

[57] 5'-GGA-3'로 표현되는 제7 서열; 및

[58] 5'-AUGCAAC-3'로 표현되는 제8 서열.

[59] 상기 과제를 해결하기 위해, 본 명세서에서는 다음을 포함하는
 CRISPR/Cas12f1 시스템을 위한 엔지니어링 된 가이드 RNA를 개시한다:

[60] 엔지니어링 된 스캐폴드 영역; 및

[61] 스페이서;

[62] 이때, 상기 스페이서는 10 내지 30 뉴클레오타이드 길이를 가지며, 표적 서열과
 상보적인 서열을 가지며,

[63] 상기 엔지니어링 된 스캐폴드 영역의 서열은 다음 서열을 포함함:

[64] 5'말단에서 3'말단 방향으로,

[65] 5'-A-3', 5'-AA-3', 5'-GAA-3', 5'-AGAA-3', 5'-GAGAA-3', 5'-GGAGAA-3',

5'-UGGAGAA-3', 5'-GUGGAGAA-3', 5'-AGUGGAGAA-3',

5'-AAGUGGAGAA-3'(서열번호 16), 5'-AAAGUGGAGAA-3'(서열번호 17),

5'-UAAAGUGGAGAA-3'(서열번호 18), 5'-AUAAAGUGGAGAA-3'(서열번호 19),

5'-GAUAAAGUGGAGAA-3'(서열번호 20),
 5'-UGAUAAAGUGGAGAA-3'(서열번호 21),
 5'-CUGAUAAAGUGGAGAA-3'(서열번호 22),
 5'-ACUGAUAAAGUGGAGAA-3'(서열번호 23),
 5'-CACUGAUAAAGUGGAGAA-3'(서열번호 24),
 5'-UCACUGAUAAAGUGGAGAA-3'(서열번호 25),
 5'-UUCACUGAUAAAGUGGAGAA-3'(서열번호 26), 및
 5'-CUUCACUGAUAAAGUGGAGAA-3'(서열번호 9)로 이루어진 군에서 선택된 서열,

- [66] 5'-CCGCUUCACUUAGAGUGAAGGUGG-3'(서열번호 430),
 5'-CCGCUUCACCUUAGGAGUGAAGGUGG-3'(서열번호 431),
 5'-CCGCUUCACCAUUAGUGAGUGAAGGUGG-3'(서열번호 38),
 5'-CCGCUUCACCAAUUAGUUGAGUGAAGGUGG-3'(서열번호 39),
 5'-CCGCUUCACCAAAUUAGCUUGAGUGAAGGUGG-3'(서열번호 40),
 5'-CCGCUUCACCAAAAUUAGACUUGAGUGAAGGUGG-3'(서열번호 41),
 5'-CCGCUUCACCAAAAAGUUAGAACUUGAGUGAAGGUGG-3'(서열번호 42),
 5'-CCGCUUCACCAAAAAGCUUAGGAACUUGAGUGAAGGUGG-3'(서열번호 43),
 5'-CCGCUUCACCAAAAAGCUUUAGAGAACUUGAGUGAAGGUGG-3'(서열번호 44),
 5'-CCGCUUCACCAAAAAGCUGUUAGUUAGAACUUGAGUGAAGGUGG-3'(서열번호 45),
 5'-CCGCUUCACCAAAAAGCUGUUAGUAGAACUUGAGUGAAGGUGG-3'(서열번호 46),
 5'-CCGCUUCACCAAAAAGCUGUUUAGAUUAGAACUUGAGUGAAGGUGG-3'(서열번호 47),
 5'-CCGCUUCACCAAAAAGCUGUCUUAGGAUUAGAACUUGAGUGAAGGUGG-3'(서열번호 48),
 5'-CCGCUUCACCAAAAAGCUGUCCUUAGGGAUUAGAACUUGAGUGAAGGUGG-3'(서열번호 49), 및
 5'-CCGCUUCACCAAAAAGCUGUCCCUUAGGGGAUUAGAACUUGAGUGAAGGUGG-3'(서열번호 10)로 이루어진 군에서 선택된 서열,

- [67] 5'-GCUGCUUGCAUCAGCCUAAUGUCGAGAAGUGCUUUCUUCGGAAAGUAACCCUCGA-3'(서열번호 11), 및

- [68] 5'-AACAAA-3', 5'-AACAAAU-3', 5'-AACAAAUU-3', 5'-AACAAAUUC-3',
 5'-AACAAAUUCA-3'(서열번호 66), 5'-AACAAAUUCAU-3'(서열번호 67),
 5'-AACAAAUUCAUU-3'(서열번호 68), 및 5'-AACAAAUUCAUUU-3'(서열번호 12)로 이루어진 군에서 선택된 서열이 연결된 엔지니어링 된 tracrRNA; 및

- [69] 5'-GGA-3', 5'-AGGA-3', 5'-AAGGA-3', 5'-GAAGGA-3', 5'-UGAAGGA-3', 5'-AUGAAGGA-3', 5'-AAUGAAGGA-3', 및 5'-GAAUGAAGGA-3'(서열번호 14)으로 이루어진 군에서 선택된 서열, 및
- [70] 5'-AUGCAAC-3'가 연결된 엔지니어링 된 crRNA 반복 서열 부분,
- [71] 이때, 상기 엔지니어링 된 crRNA 반복 서열 부분의 3'말단은 상기 스페이서의 5'말단과 연결 되어 있으며,
- [72] 상기 엔지니어링 된 tracrRNA의 서열이 5'-CUUCACUGAUAAAGUGGAGAACCGCUUCACCAAAAGCUGUCCCUUAGG GGAUUAGAACUUGAGUGAAGGUGGGCUGCUUGCAUCAGCCUAAUGUCGA GAAGUGCUUUCUUCGGAAAGUAACCCUCGAAACAAAUUCAUUU-3'(서열번호 1)과 동일하고, 및 상기 엔지니어링 된 crRNA 반복 서열이 5'-GAAUGAAGGAAUGCAAC-3'(서열번호 3)과 동일한 경우는 제외되는 것을 특징으로 함.
- [73]
- [74] 일 구현예로 본 명세서에서는 다음을 포함하는, 엔지니어링 된 CRISPR/Cas12f1 복합체를 개시한다:
- [75] Cas12f1 단백질; 및
- [76] 엔지니어링 된 가이드 RNA,
- [77] 이때, 상기 엔지니어링 된 가이드 RNA는 다음을 포함함:
- [78] 엔지니어링 된 스캐폴드 영역; 및
- [79] 스페이서;
- [80] 이때, 상기 엔지니어링 된 가이드 RNA는 5'말단에서 3'말단 방향으로, 엔지니어링 된 스캐폴드 영역, 및 스페이서가 순서대로 연결되어 있고,
- [81] 상기 스페이서는 10개 이상 50개 이하의 뉴클레오타이드를 포함하며, 표적 서열과 상보적인 서열을 가지고,
- [82] 상기 엔지니어링 된 스캐폴드 영역의 서열은 5'-CUUCACUGAUAAAGUGGAGAACCGCUUCACCAAAAGCUGUCCCUUAGG GGAUUAGAACUUGAGUGAAGGUGGGCUGCUUGCAUCAGCCUAAUGUCGA GAAGUGCUUUCUUCGGAAAGUAACCCUCGAAACAAAUUCAUUUGAAAGA AUGAAGGAAUGCAAC-3'(서열번호 7)과 상이한 것을 특징으로 하며,
- [83] 상기 엔지니어링 된 스캐폴드 영역의 서열은 5'말단에서 3'말단 방향으로 다음 서열이 순서대로 연결된 것임:
- [84] 5'-A-3', 5'-AA-3', 5'-GAA-3', 5'-AGAA-3', 5'-GAGAA-3', 5'-GGAGAA-3', 5'-UGGAGAA-3', 5'-GUGGAGAA-3', 5'-AGUGGAGAA-3', 5'-AAGUGGAGAA-3'(서열번호 16), 5'-AAAGUGGAGAA-3'(서열번호 17), 5'-UAAAGUGGAGAA-3'(서열번호 18), 5'-AUAAAGUGGAGAA-3'(서열번호 19), 5'-GAUAAAGUGGAGAA-3'(서열번호 20), 5'-UGAUAAAGUGGAGAA-3'(서열번호 21),

5'-CUGAUAAAGUGGAGAA-3'(서열번호 22),
 5'-ACUGAUAAAGUGGAGAA-3'(서열번호 23),
 5'-CACUGAUAAAGUGGAGAA-3'(서열번호 24),
 5'-UCACUGAUAAAGUGGAGAA-3'(서열번호 25),
 5'-UUCACUGAUAAAGUGGAGAA-3'(서열번호 26), 및
 5'-CUUCACUGAUAAAGUGGAGAA-3'(서열번호 9)로 이루어진 군에서 선택된 서열;

- [85] 5'-CCGCUUCACUUAGAGUGAAGGUGG-3'(서열번호 430),
 5'-CCGCUUCACCUUAGGAGUGAAGGUGG-3'(서열번호 431),
 5'-CCGCUUCACCAUUAGUGAGUGAAGGUGG-3'(서열번호 38),
 5'-CCGCUUCACCAAUUAGUUGAGUGAAGGUGG-3'(서열번호 39),
 5'-CCGCUUCACCAAAUUAGCUUGAGUGAAGGUGG-3'(서열번호 40),
 5'-CCGCUUCACCAAAAUUAGACUUGAGUGAAGGUGG-3'(서열번호 41),
 5'-CCGCUUCACCAAAAAGUUAGAACUUGAGUGAAGGUGG-3'(서열번호 42),
 5'-CCGCUUCACCAAAAAGCUUAGGAACUUGAGUGAAGGUGG-3'(서열번호 43),
 5'-CCGCUUCACCAAAAAGCUUUAGAGAACUUGAGUGAAGGUGG-3'(서열번호 44),
 5'-CCGCUUCACCAAAAAGCUGUUAGUUAGAACUUGAGUGAAGGUGG-3'(서열번호 45),
 5'-CCGCUUCACCAAAAAGCUGUUAGUAGAACUUGAGUGAAGGUGG-3'(서열번호 46),
 5'-CCGCUUCACCAAAAAGCUGUUUAGAUUAGAACUUGAGUGAAGGUGG-3'(서열번호 47),
 5'-CCGCUUCACCAAAAAGCUGUCUUAGGAUUAGAACUUGAGUGAAGGUGG-3'(서열번호 48),
 5'-CCGCUUCACCAAAAAGCUGUCCUUAGGGAUUAGAACUUGAGUGAAGGUGG-3'(서열번호 49), 및
 5'-CCGCUUCACCAAAAAGCUGUCCCUUAGGGGAUUAGAACUUGAGUGAAGGUGG-3'(서열번호 10)로 이루어진 군에서 선택된 서열;

- [86] 5'-GCUGCUUGCAUCAGCCUAAUGUCGAGAAGUGCUUUCUUCGGAAAGUAACCCUCGA-3'(서열번호 11);

- [87] 5'-AACAAAGAAAGGA-3'(서열번호 110),
 5'-AACAAUUGAAAAGGA-3'(서열번호 111),
 5'-AACAAUUGAAAAAGGA-3'(서열번호 112),
 5'-AACAAUUCGAAAGAAGGA-3'(서열번호 113),
 5'-AACAAUUCAGAAAUGAAGGA-3'(서열번호 114),
 5'-AACAAUUC AUGAAAUGAAGGA-3'(서열번호 115),

5'-AACAAAUUCAUUGAAAAAUGAAGGA-3'(서열번호 116), 및
5'-AACAAAUUCAUUUGAAAGAAUGAAGGA-3'(서열번호 117)에서 선택된
서열; 및

[88] 5'-AUGCAAC-3'.

[89]

[90] 일 구현예로, 본 명세서에서는 다음을 포함하는, CRISPR/Cas12f1 시스템의 각
구성요소를 발현할 수 있는 벡터를 개시한다:

[91] Cas12f1 단백질을 암호화하는 핵산 서열을 포함하는 제1 서열;

[92] 상기 제1 서열과 작동 가능하게 연결된 제1 프로모터 서열;

[93] 엔지니어링 된 가이드 RNA를 암호화하는 핵산 서열을 포함하는 제2 서열; 및

[94] 상기 제2 서열과 작동 가능하게 연결된 제2 프로모터 서열,

[95] 이때, 상기 엔지니어링 된 가이드 RNA는 다음을 포함함:

[96] 엔지니어링 된 스캐폴드 영역; 및

[97] 스페이서;

[98] 이때, 상기 엔지니어링 된 가이드 RNA는 5'말단에서 3'말단 방향으로,

엔지니어링 된 스캐폴드 영역, 및 스페이서가 순서대로 연결되어 있고,

[99] 상기 스페이서는 10개 이상 50개 이하의 뉴클레오타이드를 포함하며, 표적
서열과 상보적인 서열을 가지고,

[100] 상기 엔지니어링 된 스캐폴드 영역의 서열은

5'-CUUCACUGAUAAAGUGGAGAACCGCUUCACCAAAGCUGUCCCUUAGG
GGAUUAGAACUUGAGUGAAGGUGGGCUGCUUGCAUCAGCCUAAUGUCGA
GAAGUGCUUUCUUCGGAAAGUAACCCUCGAAACAAAUUCAUUUGAAAGA
AUGAAGGAAUGCAAC-3'(서열번호 7)과 상이한 것을 특징으로 하며,

[101] 상기 엔지니어링 된 스캐폴드 영역의 서열은 5'말단에서 3'말단 방향으로 다음
서열이 순서대로 연결된 것임:

[102] 5'-A-3', 5'-AA-3', 5'-GAA-3', 5'-AGAA-3', 5'-GAGAA-3', 5'-GGAGAA-3',

5'-UGGAGAA-3', 5'-GUGGAGAA-3', 5'-AGUGGAGAA-3',

5'-AAGUGGAGAA-3'(서열번호 16), 5'-AAAGUGGAGAA-3'(서열번호 17),

5'-UAAAGUGGAGAA-3'(서열번호 18), 5'-AUAAGUGGAGAA-3'(서열번호 19),

5'-GAUAAAGUGGAGAA-3'(서열번호 20),

5'-UGAUAAAGUGGAGAA-3'(서열번호 21),

5'-CUGAUAAAGUGGAGAA-3'(서열번호 22),

5'-ACUGAUAAAGUGGAGAA-3'(서열번호 23),

5'-CACUGAUAAAGUGGAGAA-3'(서열번호 24),

5'-UCACUGAUAAAGUGGAGAA-3'(서열번호 25),

5'-UUCACUGAUAAAGUGGAGAA-3'(서열번호 26), 및

5'-CUUCACUGAUAAAGUGGAGAA-3'(서열번호 9)로 이루어진 군에서 선택된
서열;

- [103] 5'-CCGCUUCACUUAGAGUGAAGGUGG-3'(서열번호 430),
 5'-CCGCUUCACCUUAGGAGUGAAGGUGG-3'(서열번호 431),
 5'-CCGCUUCACCAUUAGUGAGUGAAGGUGG-3'(서열번호 38),
 5'-CCGCUUCACCAAUUAGUUAGUGAAGGUGG-3'(서열번호 39),
 5'-CCGCUUCACCAAAUUAGCUUGAGUGAAGGUGG-3'(서열번호 40),
 5'-CCGCUUCACCAAAAUUAGACUUGAGUGAAGGUGG-3'(서열번호 41),
 5'-CCGCUUCACCAAAAGUUAGAACUUGAGUGAAGGUGG-3'(서열번호 42),
 5'-CCGCUUCACCAAAAGCUUAGGAACUUGAGUGAAGGUGG-3'(서열번호 43),
 5'-CCGCUUCACCAAAAGCUUUAGAGAACUUGAGUGAAGGUGG-3'(서열번호 44),
 5'-CCGCUUCACCAAAAGCUGUUAGUUAGAACUUGAGUGAAGGUGG-3'(서열번호 45),
 5'-CCGCUUCACCAAAAGCUGUUAGUAGAACUUGAGUGAAGGUGG-3'(서열번호 46),
 5'-CCGCUUCACCAAAAGCUGUUUAGAUUAGAACUUGAGUGAAGGUGG-3'(서열번호 47),
 5'-CCGCUUCACCAAAAGCUGUCUUAGGAUUAGAACUUGAGUGAAGGUGG-3'(서열번호 48),
 5'-CCGCUUCACCAAAAGCUGUCCUUAGGGAUUAGAACUUGAGUGAAGGUGG-3'(서열번호 49), 및
 5'-CCGCUUCACCAAAAGCUGUCCCUUAGGGGAUUAGAACUUGAGUGAAGGUGG-3'(서열번호 10)로 이루어진 군에서 선택된 서열;
- [104] 5'-GCUGCUUGCAUCAGCCUAAUGUCGAGAAGUGCUUUCUUCGGAAAGUAACCCUCGA-3'(서열번호 11);
- [105] 5'-AACAAAGAAAGGA-3'(서열번호 110),
 5'-AACAAUGAAAAGGA-3'(서열번호 111),
 5'-AACAAAUUGAAAAAGGA-3'(서열번호 112),
 5'-AACAAAUUCGAAAGAAGGA-3'(서열번호 113),
 5'-AACAAAUUCAGAAAUGAAGGA-3'(서열번호 114),
 5'-AACAAAUUCAUGAAAAUGAAGGA-3'(서열번호 115),
 5'-AACAAAUUCAUUGAAAAAUGAAGGA-3'(서열번호 116), 및
 5'-AACAAAUUCAUUUGAAAGAAUGAAGGA-3'(서열번호 117)에서 선택된 서열; 및
- [106] 5'-AUGCAAC-3'.
- [107]
- [108] 일 구현예로, 본 명세서에서는 다음을 포함하는, 세포 내에서 표적 핵산을 편집하는 방법 또는 표적 핵산을 타겟팅하는 방법을 개시한다:

- [109] Cas12f1 단백질 또는 이를 암호화하는 핵산, 및 엔지니어링 된 가이드 RNA 또는 이를 암호화하는 핵산을 세포 내로 전달하는 것,
- [110] 이로 인해 상기 세포 내에서 CRISPR/Cas12f1 복합체가 형성될 수 있으며,
- [111] 이로 인해 상기 표적 서열을 포함하는 핵산이 CRISPR/Cas12f1 복합체에 의해 편집되거나 타겟팅될 수 있고,
- [112] 상기 엔지니어링 된 가이드 RNA는 다음을 포함하는 것을 특징으로 함:
- [113] 엔지니어링 된 스캐폴드 영역; 및
- [114] 스페이서;
- [115] 이때, 상기 엔지니어링 된 가이드 RNA는 5'말단에서 3'말단 방향으로, 엔지니어링 된 스캐폴드 영역, 및 스페이서가 순서대로 연결되어 있고,
- [116] 상기 스페이서는 10개 이상 50개 이하의 뉴클레오타이드를 포함하며, 표적 서열과 상보적인 서열을 가지고,
- [117] 상기 엔지니어링 된 스캐폴드 영역의 서열은
 5'-CUUCACUGAUAAAGUGGAGAACCGCUUCACCAAAAGCUGUCCCUUAGG
 GGAUUAGAACUUGAGUGAAGGUGGGCUGCUUGCAUCAGCCUAAUGUCGA
 GAAGUGCUUUCUUCGGAAAGUAACCCUCGAAACAAAUUCAUUUGAAAGA
 AUGAAGGAAUGCAAC-3'(서열번호 7)과 상이한 것을 특징으로 하며,
- [118] 상기 엔지니어링 된 스캐폴드 영역의 서열은 5'말단에서 3'말단 방향으로 다음 서열이 순서대로 연결된 것임:
- [119] 5'-A-3', 5'-AA-3', 5'-GAA-3', 5'-AGAA-3', 5'-GAGAA-3', 5'-GGAGAA-3',
 5'-UGGAGAA-3', 5'-GUGGAGAA-3', 5'-AGUGGAGAA-3',
 5'-AAGUGGAGAA-3'(서열번호 16), 5'-AAAGUGGAGAA-3'(서열번호 17),
 5'-UAAAGUGGAGAA-3'(서열번호 18), 5'-AUAAGUGGAGAA-3'(서열번호 19),
 5'-GAUAAAGUGGAGAA-3'(서열번호 20),
 5'-UGAUAAAGUGGAGAA-3'(서열번호 21),
 5'-CUGAUAAAGUGGAGAA-3'(서열번호 22),
 5'-ACUGAUAAAGUGGAGAA-3'(서열번호 23),
 5'-CACUGAUAAAGUGGAGAA-3'(서열번호 24),
 5'-UCACUGAUAAAGUGGAGAA-3'(서열번호 25),
 5'-UUCACUGAUAAAGUGGAGAA-3'(서열번호 26), 및
 5'-CUUCACUGAUAAAGUGGAGAA-3'(서열번호 9)로 이루어진 군에서 선택된 서열;
- [120] 5'-CCGCUUCACUUAGAGUGAAGGUGG-3'(서열번호 430),
 5'-CCGCUUCACCUUAGGAGUGAAGGUGG-3'(서열번호 431),
 5'-CCGCUUCACCAUUAGUGAGUGAAGGUGG-3'(서열번호 38),
 5'-CCGCUUCACCAAUUAGUUGAGUGAAGGUGG-3'(서열번호 39),
 5'-CCGCUUCACCAAAUUAGCUUGAGUGAAGGUGG-3'(서열번호 40),
 5'-CCGCUUCACCAAAAUUAGACUUGAGUGAAGGUGG-3'(서열번호 41),

5'-CCGCUUCACCAAAAAGUUAGAACUUGAGUGAAGGUGG-3'(서열번호 42),
 5'-CCGCUUCACCAAAAAGCUUAGGAACUUGAGUGAAGGUGG-3'(서열번호 43),
 5'-CCGCUUCACCAAAAAGCUUUAGAGAACUUGAGUGAAGGUGG-3'(서열번호 44),
 5'-CCGCUUCACCAAAAAGCUGUUAGUUAGAACUUGAGUGAAGGUGG-3'(서열번호 45),
 5'-CCGCUUCACCAAAAAGCUGUUAGUAGAACUUGAGUGAAGGUGG-3'(서열번호 46),
 5'-CCGCUUCACCAAAAAGCUGUUUAGAUUAGAACUUGAGUGAAGGUGG-3'(서열번호 47),
 5'-CCGCUUCACCAAAAAGCUGUCUUAGGAUUAGAACUUGAGUGAAGGUGG-3'(서열번호 48),
 5'-CCGCUUCACCAAAAAGCUGUCCUUAGGGAUUAGAACUUGAGUGAAGGUGG-3'(서열번호 49), 및
 5'-CCGCUUCACCAAAAAGCUGUCCCUUAGGGGAUUAGAACUUGAGUGAAGGUGG-3'(서열번호 10)로 이루어진 군에서 선택된 서열;

[121] 5'-GCUGCUUGCAUCAGCCUAAUGUCGAGAAGUGCUUUCUUCGGAAAGUAACCCUCGA-3'(서열번호 11);

[122] 5'-AACAAAGAAAGGA-3'(서열번호 110),
 5'-AACAAAUGAAAAGGA-3'(서열번호 111),
 5'-AACAAAUUGAAAAAGGA-3'(서열번호 112),
 5'-AACAAAUUCGAAAGAAGGA-3'(서열번호 113),
 5'-AACAAAUUCAGAAAUGAAGGA-3'(서열번호 114),
 5'-AACAAAUUCAUGAAAAUGAAGGA-3'(서열번호 115),
 5'-AACAAAUUCAUUGAAAAAUGAAGGA-3'(서열번호 116), 및
 5'-AACAAAUUCAUUUGAAAGAAUGAAGGA-3'(서열번호 117)에서 선택된 서열; 및

[123] 5'-AUGCAAC-3'.

[124]

[125] 일 구현예로, 본 명세서에서는 다음을 포함하는, 세포 내에서 표적 핵산을 편집하는 방법 또는 표적 핵산을 타겟팅하는 방법을 개시한다:

[126] Cas12f1 단백질 또는 이를 암호화하는 핵산, 및 엔지니어링 된 가이드 RNA 또는 이를 암호화하는 핵산을 세포 내로 전달하는 것,

[127] 이로 인해 상기 세포 내에서 CRISPR/Cas12f1 복합체가 형성될 수 있으며,

[128] 이로 인해 상기 표적 핵산이 CRISPR/Cas12f1 복합체에 의해 편집되거나 또는 타겟팅될 수 있고,

[129] 상기 엔지니어링 된 가이드 RNA는 다음을 포함하는 것을 특징으로 함:

- [130] 엔지니어링 된 스캐폴드 영역; 및
- [131] 스페이서; 및
- [132] 이때, 상기 엔지니어링 된 가이드 RNA는 5'말단에서 3'말단 방향으로, 엔지니어링 된 스캐폴드 영역, 및 스페이서가 순서대로 연결되어 있고,
- [133] 상기 스페이서는 10개 이상 50개 이하의 뉴클레오타이드를 포함하며, 표적 서열과 상보적인 서열을 가지고,
- [134] 상기 엔지니어링 된 스캐폴드 영역의 서열은
 5'-CUUCACUGAUAAAGUGGAGAACCGCUUCACCAAAAGCUGUCCCUUAGG
 GGAUUAGAACUUGAGUGAAGGUGGGCUGCUUGCAUCAGCCUAAUGUCGA
 GAAGUGCUUUCUUCGGAAAGUAACCCUCGAAACAAAUUCAUUUUUCCUC
 UCCAAUUCUGCACAAGAAAGUUGCAGAACCCGAAUAGACGAAUGAAGGA
 AUGCAAC-3'(서열번호 315)과 상이한 것을 특징으로 하며,
- [135] 상기 엔지니어링 된 스캐폴드 영역의 서열은 5'말단에서 3'말단 방향으로 다음 서열이 순서대로 연결된 것임:
- [136] 5'-A-3', 5'-AA-3', 5'-GAA-3', 5'-AGAA-3', 5'-GAGAA-3', 5'-GGAGAA-3',
 5'-UGGAGAA-3', 5'-GUGGAGAA-3', 5'-AGUGGAGAA-3',
 5'-AAGUGGAGAA-3'(서열번호 16), 5'-AAAGUGGAGAA-3'(서열번호 17),
 5'-UAAAGUGGAGAA-3'(서열번호 18), 5'-AUAAAGUGGAGAA-3'(서열번호 19),
 5'-GAUAAAGUGGAGAA-3'(서열번호 20),
 5'-UGAUAAAGUGGAGAA-3'(서열번호 21),
 5'-CUGAUAAAGUGGAGAA-3'(서열번호 22),
 5'-ACUGAUAAAGUGGAGAA-3'(서열번호 23),
 5'-CACUGAUAAAGUGGAGAA-3'(서열번호 24),
 5'-UCACUGAUAAAGUGGAGAA-3'(서열번호 25),
 5'-UUCACUGAUAAAGUGGAGAA-3'(서열번호 26), 및
 5'-CUUCACUGAUAAAGUGGAGAA-3'(서열번호 9)로 이루어진 군에서 선택된 서열;
- [137] 5'-CCGCUUCACUAGAGUGAAGGUGG-3'(서열번호 430),
 5'-CCGCUUCACCUAGGAGUGAAGGUGG-3'(서열번호 431),
 5'-CCGCUUCACCAUAGUGAGUGAAGGUGG-3'(서열번호 38),
 5'-CCGCUUCACCAAUAGUUGAGUGAAGGUGG-3'(서열번호 39),
 5'-CCGCUUCACCAAAUAGCUUGAGUGAAGGUGG-3'(서열번호 40),
 5'-CCGCUUCACCAAAAUAGACUUGAGUGAAGGUGG-3'(서열번호 41),
 5'-CCGCUUCACCAAAAGUUAGAACUUGAGUGAAGGUGG-3'(서열번호 42),
 5'-CCGCUUCACCAAAAGCUUAGGAACUUGAGUGAAGGUGG-3'(서열번호 43),
 5'-CCGCUUCACCAAAAGCUUUAGAGAACUUGAGUGAAGGUGG-3'(서열번호 44),

5'-CCGCUUCACCAAAAAGCUGUUAGUUAGAACUUGAGUGAAGGUGG-3'(서열
번호 45),

5'-CCGCUUCACCAAAAAGCUGUUAGUAGAACUUGAGUGAAGGUGG-3'(서열
번호 46),

5'-CCGCUUCACCAAAAAGCUGUUUAGAUUAGAACUUGAGUGAAGGUGG-3'(서열
번호 47),

5'-CCGCUUCACCAAAAAGCUGUCUUAGGAUUAGAACUUGAGUGAAGGUGG-3'(서열
번호 48),

5'-CCGCUUCACCAAAAAGCUGUCCUUAGGGAUUAGAACUUGAGUGAAGGU
GG-3'(서열번호 49), 및

5'-CCGCUUCACCAAAAAGCUGUCCCUUAGGGGAUUAGAACUUGAGUGAAG
GUGG-3'(서열번호 10)로 이루어진 군에서 선택된 서열;

[138] 5'-GCUGCUUGCAUCAGCCUAAUGUCGAGAAGUGCUUUCUUCGGAAAGU
AACCCUCGA-3'(서열번호 11);

[139] 5'-AACAAAGAAAGGA-3'(서열번호 110),

5'-AACAAAUGAAAAGGA-3'(서열번호 111),

5'-AACAAAUUGAAAAAGGA-3'(서열번호 112),

5'-AACAAAUUCGAAAGAAGGA-3'(서열번호 113),

5'-AACAAAUUCAGAAAUGAAGGA-3'(서열번호 114),

5'-AACAAAUUCAUGAAAUGAAGGA-3'(서열번호 115),

5'-AACAAAUUCAUUGAAAAUGAAGGA-3'(서열번호 116),

5'-AACAAAUUCAUUUGAAAGAAUGAAGGA-3'(서열번호 117),

5'-AACAAAUUCAUUUUGAAACGAAUGAAGGA-3'(서열번호 293),

5'-AACAAAUUCAUUUUUGAAAACGAAUGAAGGA-3'(서열번호 294),

5'-AACAAAUUCAUUUUUCGAAAGACGAAUGAAGGA-3'(서열번호 295),

5'-AACAAAUUCAUUUUUCCGAAAAGACGAAUGAAGGA-3'(서열번호 296),

5'-AACAAAUUCAUUUUUCCUGAAAUAGACGAAUGAAGGA-3'(서열번호
297),

5'-AACAAAUUCAUUUUUCCUCGAAAAUAGACGAAUGAAGGA-3'(서열번호
298),

5'-AACAAAUUCAUUUUUCCUCUGAAAAUAGACGAAUGAAGGA-3'(서열번
호 299),

5'-AACAAAUUCAUUUUUCCUCUCGAAAGAAUAGACGAAUGAAGGA-3'(서
열번호 300),

5'-AACAAAUUCAUUUUUCCUCUCCGAAACGAAUAGACGAAUGAAGGA-3'(서
열번호 301),

5'-AACAAAUUCAUUUUUCCUCUCCAGAAACCGAAUAGACGAAUGAAGGA-3'(서열
번호 302),

5'-AACAAAUUCAUUUUUCCUCUCCAAGAAACCCGAAUAGACGAAUGAAGGA-3'(서열번호 303),
 5'-AACAAAUUCAUUUUUCCUCUCCAUGAAAACCCGAAUAGACGAAUGAAGGA-3'(서열번호 304),
 5'-AACAAAUUCAUUUUUCCUCUCCA AUUGAAAAACCCGAAUAGACGAAUGAAGGA-3'(서열번호 305),
 5'-AACAAAUUCAUUUUUCCUCUCCA AUUCGAAAGAACCCGAAUAGACGAAUGAAGGA-3'(서열번호 306),
 5'-AACAAAUUCAUUUUUCCUCUCCA AUUCUGAAAAGAACCCGAAUAGACGAAUGAAGGA-3'(서열번호 307),
 5'-AACAAAUUCAUUUUUCCUCUCCA AUUCUGGAAACAGAACCCGAAUAGACGAAUGAAGGA-3'(서열번호 308),
 5'-AACAAAUUCAUUUUUCCUCUCCA AUUCUGCGAAAGCAGAACCCGAAUGACGAAUGAAGGA-3'(서열번호 309),
 5'-AACAAAUUCAUUUUUCCUCUCCA AUUCUGCAGAAAUGCAGAACCCGAAUAGACGAAUGAAGGA-3'(서열번호 310),
 5'-AACAAAUUCAUUUUUCCUCUCCA AUUCUGCACGAAAUGCAGAACCCGAAUAGACGAAUGAAGGA-3'(서열번호 311),
 5'-AACAAAUUCAUUUUUCCUCUCCA AUUCUGCACAGAAAGUUGCAGAACCCGAAUAGACGAAUGAAGGA-3'(서열번호 312),
 5'-AACAAAUUCAUUUUUCCUCUCCA AUUCUGCACAGAAAUGCAGAACCCGAAUAGACGAAUGAAGGA-3'(서열번호 313), 및
 5'-AACAAAUUCAUUUUUCCUCUCCA AUUCUGCACAAGAAAGUUGCAGAACCCGAAUAGACGAAUGAAGGA-3'(서열번호 314)로 이루어진 군에서 선택된 서열; 및

[140] 5'-AUGCAAC-3'.

[141]

발명의 효과

[142] 본 명세서에서 제공하는 엔지니어링 된 스캐폴드 영역을 가지는 엔지니어링 된 Cas12f1 가이드 RNA를 포함하는 CRISPR/Cas12f1 시스템을 유전자 편집에 사용하는 경우, 자연계에서 발견되는 CRISPR/Cas12f1 시스템을 사용할 때와 비교해 높은 유전자 편집 효율을 나타낸다.

[143]

도면의 간단한 설명

[144] 도 1은 본 명세서에서 개시하는 엔지니어링 된 Cas12f1 가이드 RNA를 예시적으로 나타낸 모식도이다.

[145] 도 2는 실험예 2에 개시된 실시예 중, DY2를 표적으로 하는 Example 1.1 내지

Example 1.3에 대한 indel 효율의 평균을 나타낸 그래프이다. 이때, Ex 는 Example, Comp는 Comparative Example을 나타내는 약어이며, Control은 CRISPR/Cas12f1을 처리하지 않은 음성 대조군을 나타낸다.

- [146] 도 3은 실험예 2에 개시된 실시예 중, DY2를 표적으로 하는 Example 1.7 내지 Example 1.9에 대한 indel 효율의 평균을 나타낸 그래프이다. 이때, Ex 는 Example, Comp는 Comparative Example을 나타내는 약어이며, Control은 CRISPR/Cas12f1을 처리하지 않은 음성 대조군을 나타낸다.
- [147] 도 4는 실험예 2에 개시된 실시예 중, DY2를 표적으로 하는 Example 1.11 내지 Example 1.13에 대한 indel 효율의 평균을 나타낸 그래프이다. 이때, Ex 는 Example, Comp는 Comparative Example을 나타내는 약어이며, Control은 CRISPR/Cas12f1을 처리하지 않은 음성 대조군을 나타낸다.
- [148] 도 5는 실험예 2에 개시된 실시예 중, DY10을 표적으로 하는 Example 2.1 내지 Example 2.3에 대한 indel 효율의 평균을 나타낸 그래프이다. 이때, Ex 는 Example, Comp는 Comparative Example을 나타내는 약어이며, Control은 CRISPR/Cas12f1을 처리하지 않은 음성 대조군을 나타낸다.
- [149] 도 6은 실험예 2에 개시된 실시예 중, DY10을 표적으로 하는 Example 2.4 내지 Example 2.6에 대한 indel 효율의 평균을 나타낸 그래프이다. 이때, Ex 는 Example, Comp는 Comparative Example을 나타내는 약어이며, Control은 CRISPR/Cas12f1을 처리하지 않은 음성 대조군을 나타낸다.
- [150] 도 7은 실험예 2에 개시된 실시예 중, DY10을 표적으로 하는 Example 2.7 내지 Example 2.9에 대한 indel 효율의 평균을 나타낸 그래프이다. 이때, Ex 는 Example, Comp는 Comparative Example을 나타내는 약어이며, Control은 CRISPR/Cas12f1을 처리하지 않은 음성 대조군을 나타낸다.
- [151] 도 8은 실험예 2에 개시된 실시예 중, DY10을 표적으로 하는 Example 2.10 내지 Example 2.13에 대한 indel 효율의 평균을 나타낸 그래프이다. 이때, Ex 는 Example, Comp는 Comparative Example을 나타내는 약어이며, Control은 CRISPR/Cas12f1을 처리하지 않은 음성 대조군을 나타낸다.
- [152] 도 9는 실험예 2에 개시된 실시예 중, Intergenic-22를 표적으로 하는 Example 3.1 내지 Example 3.3에 대한 indel 효율의 평균을 나타낸 그래프이다. 이때, Ex 는 Example, Comp는 Comparative Example을 나타내는 약어이며, Control은 CRISPR/Cas12f1을 처리하지 않은 음성 대조군을 나타낸다.
- [153] 도 10은 실험예 2에 개시된 실시예 중, Intergenic-22를 표적으로 하는 Example 3.4 내지 Example 3.6에 대한 indel 효율의 평균을 나타낸 그래프이다. 이때, Ex 는 Example, Comp는 Comparative Example을 나타내는 약어이며, Control은 CRISPR/Cas12f1을 처리하지 않은 음성 대조군을 나타낸다.
- [154] 도 11은 실험예 2에 개시된 실시예 중, Intergenic-22를 표적으로 하는 Example 3.7 내지 Example 3.9에 대한 indel 효율의 평균을 나타낸 그래프이다. 이때, Ex 는 Example, Comp는 Comparative Example을 나타내는 약어이며, Control은

CRISPR/Cas12f1을 처리하지 않은 음성 대조군을 나타낸다.

[155] 도 12는 실험예 2에 개시된 실시예 중, Intergenic-22를 표적으로 하는 Example 3.10 내지 Example 3.13에 대한 indel 효율의 평균을 나타낸 그래프이다. 이때, Ex는 Example, Comp는 Comparative Example을 나타내는 약어이며, Control은 CRISPR/Cas12f1을 처리하지 않은 음성 대조군을 나타낸다.

[156] 도 13은 실험예 2에 개시된 실시예 중, DY2를 표적으로 하는 Example 1.13 내지 Example 1.14, DY10을 표적으로 하는 Example 2.13 내지 Example 2.14, Intergenic-22를 표적으로 하는 Example 3.13 내지 Example 3.14에 대한 indel 효율의 평균을 나타낸 그래프이다. 이때, Ex는 Example, Comp는 Comparative Example을 나타내는 약어이며, Control은 CRISPR/Cas12f1을 처리하지 않은 음성 대조군을 나타낸다.

[157]

발명의 실시를 위한 최선의 형태

[158] 용어의 정의

[159] 약

[160] 본 명세서에서 사용되는 "약"이라는 용어는 참조 양, 수준, 값, 수, 빈도, 퍼센트, 치수, 크기, 양, 중량 또는 길이에 대해 30, 25, 20, 15, 10, 9, 8, 7, 6, 5, 4, 3, 2 또는 1% 정도로 변하는 양, 수준, 값, 수, 빈도, 퍼센트, 치수, 크기, 양, 중량 또는 길이를 의미한다.

[161] A.T.C.G. 및 U

[162] 본 명세서에서 사용되는 A, T, C, G 및 U 기호는 당업계 통상의 기술자가 이해하는 의미로 해석된다. 문맥 및 기술에 따라 DNA 또는 RNA 상에서 염기, 뉴클레오타이드 또는 뉴클레오타이드로 적절히 해석될 수 있다. 예를 들어, 염기를 의미하는 경우는 각각 아데닌(A), 티민(T), 시토신(C), 구아닌(G) 또는 우라실(U) 자체로 해석될 수 있고, 뉴클레오타이드를 의미하는 경우는 각각 아데노신(A), 티민(T), 시티딘(C), 구아노신(G) 또는 유리딘(U)으로 해석될 수 있으며, 서열에서 뉴클레오타이드를 의미하는 경우는 상기 각각의 뉴클레오타이드를 포함하는 뉴클레오타이드를 의미하는 것으로 해석된다.

[163] 작동 가능하게 연결된(operably linked)

[164] 본 명세서에서 사용되는 "작동 가능하게 연결된"이라는 용어는 유전자 발현에 있어서, 특정 구성이 다른 구성과 연결되어, 의도된 방식대로 기능할 수 있도록 연결되어 있는 것을 의미한다. 예를 들어, 프로모터 서열이 암호화 서열과 작동 가능하게 연결되었다고 할 때, 상기 프로모터가 상기 암호화 서열의 세포 내에서의 전사 및/또는 발현에 영향을 미칠 수 있도록 연결된 것을 의미한다. 또한, 상기 용어는 당업계 통상의 기술자가 인식할 수 있는 의미를 모두 포함하며, 문맥에 따라 적절히 해석될 수 있다.

[165] 표적 유전자 또는 표적 핵산

[166] 본 명세서에서 사용되는 "표적 유전자(target gene)" 또는 "표적 핵산(target nucleic acids)"은 기본적으로, 유전자 편집의 대상이 되는 세포 내 유전자, 또는 핵산을 의미한다. 상기 표적 유전자 또는 표적 핵산은 혼용되어 사용될 수 있으며, 서로 동일한 대상을 지칭할 수 있다. 상기 표적 유전자 또는 표적 핵산은 달리 기재되지 않은 한, 대상 세포가 가진 고유한 유전자 또는 핵산, 혹은 외부 유래의 유전자 또는 핵산 모두를 의미할 수 있으며, 편집의 대상이 될 수 있다면 특별히 제한되지 않는다. 상기 표적 유전자 또는 표적 핵산은 표적 서열 또는 표적 서열의 인접 부위를 포함할 수 있다. 상기 표적 유전자 또는 표적 핵산은 단일가닥 DNA, 이중가닥 DNA, 및/또는 RNA일 수 있다. 또한, 상기 용어는 당업계 통상의 기술자가 인식할 수 있는 의미를 모두 포함하며, 문맥에 따라 적절히 해석될 수 있다.

[167] 표적 서열 또는 인식서열

[168] 본 명세서에서 사용되는 "표적 서열(target sequence)" 또는 "인식 서열(recognition sequence)"은 CRISPR/Cas 복합체가 표적 유전자 또는 표적 핵산을 절단하기 위해 인식하는 특정 서열을 의미한다. 상기 표적 서열은 그 목적에 따라 적절히 선택될 수 있다. 구체적으로, "표적 서열"은 상기 전술한 표적 유전자 또는 표적 핵산 내에 포함된 서열일 수 있고, 본 명세서에서 제공하는 가이드 RNA, 또는 엔지니어링 된 가이드 RNA에 포함된 스페이서 서열과 상보성을 가지는 서열을 의미한다. 일반적으로, 상기 스페이서 서열은 표적 유전자 또는 표적 핵산의 서열 및 CRISPR/Cas 시스템의 이펙터 단백질이 인식하는 PAM 서열을 고려하여 결정된다. 본 명세서에서, 상기 표적 서열은 CRISPR/Cas 복합체의 가이드 RNA와 상보적으로 결합하는 특정 가닥만을 지칭할 수 있으며, 상기 특정 가닥 부분을 포함하는 표적 이중 가닥 전체를 지칭할 수도 있으며, 이는 문맥에 따라 적절히 해석된다. 또한, 상기 용어는 당업계 통상의 기술자가 인식할 수 있는 의미를 모두 포함하며, 문맥에 따라 적절히 해석될 수 있다.

[169] 벡터

[170] 본 명세서에서 사용되는 "벡터"는 달리 특정되지 않는 한, 유전 물질을 세포 내로 운반할 수 있는 모든 물질을 통틀어 일컫는다. 예를 들어, 벡터는 대상이 되는 유전 물질, 예를 들어 CRISPR/Cas 시스템의 이펙터 단백질을 암호화하는 핵산, 및/또는 가이드 RNA를 암호화하는 핵산을 포함하는 DNA 분자일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다. 상기 용어는 당업계 통상의 기술자가 인식할 수 있는 의미를 모두 포함하며, 문맥에 따라 적절히 해석될 수 있다.

[171] 자연계에서 발견되는

[172] 본 명세서에서 "자연계에서 발견되는(occurred in nature)" 이라는 용어는, 자연계에서 발견되는, 인위적으로 변형되지 않은 대상을 의미하며, 인위적인 변형이 가해진 "엔지니어링 된 대상"과 구분하기 위해 사용된다. 상기 "자연계에서 발견되는" 유전자, 핵산, DNA, RNA 등은 야생형(wild type, original

form) 및 mature form (active form)의 유전자, 핵산, DNA, RNA를 모두 포괄하는 개념으로 사용된다. 상기 용어는 그 외 통상의 기술자가 인식할 수 있는 의미를 모두 포함하며, 문맥에 따라 적절히 해석되어야 한다.

[173] 엔지니어링 된

[174] 본 명세서에서 사용되는 "엔지니어링 된(engineered)"이란 용어는 자연계에 이미 존재하는 구성을 가진 물질, 분자 등과 구분하기 위해 사용하는 용어로, 상기 물질, 분자 등에 인위적인 변형이 가해진 것을 의미한다. 예를 들어, "엔지니어링 된 가이드 RNA"의 경우, 자연계에 존재하는 가이드 RNA의 구성에 인위적인 변형이 가해진 가이드 RNA를 의미한다. 또한, 상기 용어는 당업계 통상의 기술자가 인식할 수 있는 의미를 모두 포함하며, 문맥에 따라 적절히 해석될 수 있다.

[175] NLS(Nuclear Localization Sequence, or Signal)

[176] 본 명세서에서 "NLS"라 함은, 핵 수송(nuclear transport) 작용으로 세포 핵 외부의 물질을 핵 내부로 수송할 때, 수송 대상인 단백질에 붙어 일종의 "태그"역할을 하는 일정 길이의 펩타이드, 또는 그 서열을 의미한다. 구체적으로, 상기 NLS는 아미노산 서열 PKKKRKV(서열번호 277)를 갖는 SV40 바이러스 대형 T-항원의 NLS; 뉴클레오플라스민(nucleoplasmin)으로부터의 NLS(예를 들어, 서열 KRPAATKKAGQAKKKK(서열번호 278)를 갖는 뉴클레오플라스민 이분(bipartite) NLS); 아미노산 서열 PAAKRVKLD(서열번호 279) 또는 RQRRNELKRSP(서열번호 280)를 갖는 c-myc NLS; 서열 NQSSNFGPMKGGNFGGRSSGPYGGGGQYFAKPRNQGGY(서열번호 281)를 갖는 hRNPA1 M9 NLS; 임포틴-알파로부터의 IBB 도메인의 서열 RMRIZFKNKGKDTAELRRRRVEVSVELRKAKKDEQILKRRNV(서열번호 282); 마이오 마(myoma) T 단백질의 서열 VSRKRPRP(서열번호 283) 및 PPKKARED(서열번호 284); 인간 p53의 서열 PQPKKKPL(서열번호 285); 마우스 c-abl IV의 서열 SALIKKKKKMAP(서열번호 286); 인플루엔자 바이러스 NS1의 서열 DRLRR(서열번호 287) 및 PKQKKRK(서열번호 288); 간염 바이러스 델타 항원의 서열 RKLKKKIKKL(서열번호 289); 마우스 Mx1 단백질의 서열 REKKKFLKRR(서열번호 290); 인간 폴리(ADP-리보스) 중합효소의 서열 KRKGDEVGDGVDEVAKKKSKK(서열번호 291); 또는 스테로이드 호르몬 수용체(인간) 글루코코르티코이드의 서열 RKCLQAGMNLEARKTKK(서열번호 292)로부터 유래된 NLS 서열일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다. 본 명세서에서 사용되는 "NLS"라는 용어는 통상의 기술자가 인식할 수 있는 의미를 모두 포함하며, 문맥에 따라 적절하게 해석될 수 있다.

[177] NES(Nuclear Export Sequence, or Signal)

[178] 본 명세서에서 "NES"라 함은, 핵 수송(nuclear transport) 작용으로 세포 핵 내부의 물질을 핵 외부로 수송할 때, 수송 대상인 단백질에 붙어 일종의 "태그"역할을 하는 일정 길이의 펩타이드, 또는 그 서열을 의미한다. 본

명세서에서 사용되는 "NES"라는 용어는 통상의 기술자가 인식할 수 있는 의미를 모두 포함하며, 문맥에 따라 적절하게 해석될 수 있다.

[179] 태그

[180] 본 명세서에서 "태그"라 함은, 펩타이드, 또는 단백질의 수송, 추적 및/또는 분리정제를 쉽게 하기 위하여 부가되는 기능적 도메인을 통틀어 일컫는다. 구체적으로, 상기 태그는 히스티딘(His) 태그, V5 태그, FLAG 태그, 인플루엔자 헤마글루티닌(HA) 태그, Myc 태그, VSV-G 태그 및 티오레독신(Trx) 태그 등의 태그 단백질, 녹색 형광 단백질(GFP), 황색 형광 단백질(YFP), 청록색 형광 단백질(CFP), 청색 형광 단백질(BFP), HcRED, DsRed 등의 자가형광 단백질, 및 글루타티온-S-트랜스퍼라제(GST), 호스라디시(horseradish) 과산화효소(HRP), 클로람페니콜 아세틸트랜스퍼라제(CAT) 베타-갈락토시다제, 베타-글루쿠로니다제, 루시퍼라제 등의 리포터 유전자를 포함하나, 이에 제한되는 것은 아니다. 본 명세서에서 사용되는 "태그"라는 용어는 통상의 기술자가 인식할 수 있는 의미를 모두 포함하며, 문맥에 따라 적절하게 해석될 수 있다.

[181]

[182] 배경기술 - CRISPR/Cas12f1 복합체의 구조

[183] CRISPR/Cas12f 시스템

[184] CRISPR/Cas12f 시스템은 type V CRISPR/Cas 시스템 중 V-F 서브타입에 속하고, 이는 다시 V-F1 내지 V-F3의 베리언트로 나뉜다. CRISPR/Cas12f 시스템은 선행연구(Harrington et al., Programmed DNA destruction by miniature CRISPR-Cas14 enzymes, Science 362, 839-842 (2018))에서 Cas14로 명명된 이펙터 단백질 중, Cas14a, Cas14b, 및 Cas14c 변이체를 포함하는 CRISPR/Cas14 시스템을 포함한다. 이 중, Cas14a 이펙터 단백질을 포함하는 CRISPR/Cas14a 시스템은 CRISPR/Cas12f1 시스템으로 분류된다(Makarova et al., Nature Reviews, Microbiology volume 18, 67 (2020)). 최근 선행 연구(Takeda et al., Structure of the miniature type V-F CRISPR-Cas effector enzyme, Molecular Cell 81, 1-13 (2021), Xiao et al., Structural basis for the dimerization-dependent CRISPR-Cas12f nuclease, bioRxiv (2020)) 등을 통해 상기 CRISPR/Cas12f1 복합체의 구조가 밝혀진 바, 이하 이에 대해 간략히 서술한다.

[185] CRISPR/Cas12f1 복합체의 구조

[186] CRISPR/Cas12f1 복합체 내에서, Cas12f1 단백질은 두 개의 분자가 이량체 형태로 가이드 RNA와 결합하여 복합체를 이루고 있음이 밝혀졌다. 상기 Cas12f1 단백질은 amino-terminal domain (NTD) 및 carboxy-terminal domain(CTD)로 나뉘며, 상기 두 도메인이 링커 루프(linker loop)를 통해 연결되어 있는 구조이다. 상기 NTD는 wedge (WED), recognition (REC), 및 zinc finger (ZF) 도메인으로 구성되며, 상기 CTD는 또 다른 ZF 도메인 및 RuvC 도메인으로 구성된다. Cas12f1 단백질 이량체의 구조는 크게 REC 로브(REC lobe) 및 nuclease 로브(NUC lobe)로 나눌 수 있다. 상기 REC 로브는, 이량체를 구성하는 하나의 Cas12f1 단백질의 WED

도메인, ZF 도메인, 및 REC 도메인과; 이량체를 구성하는 다른 하나의 Cas12f1 단백질의 WED 도메인, ZF 도메인, 및 REC 도메인으로 구성된다. 상기 nuclease 로브는 이량체를 구성하는 하나의 Cas12f1 단백질의 RuvC 도메인 및 TNB 도메인과; 이량체를 구성하는 다른 하나의 Cas12f1 단백질의 RuvC 도메인 및 TNB 도메인으로 구성된다. 상기 Cas12f1 단백질의 각 도메인의 전부 또는 일부는 각각 Cas12f1 가이드 RNA의 스캐폴드 영역의 특정 부분을 인식하며, CRISPR/Cas12f1 복합체를 이룬다.

[187] Cas12f1 가이드 RNA의 구조

[188] 본 명세서에서, Cas12f1 가이드 RNA는 크게 기능적으로 스페이서, 및 스캐폴드 영역으로 나눌 수 있다. 상기 스캐폴드 영역은 다섯개의 Stem (Stem 1 내지 Stem 5로 명명) 및 하나의 pseudoknot (PK)로 구성된다.

[189] 통상적으로, 자연계에서 발견되는 Cas12f1 가이드 RNA는 tracrRNA 및 crRNA로 나뉘며, 상기 crRNA는 다시 crRNA 반복 서열 부분 및 스페이서로 나눌 수 있다는 것이 통상의 기술자에게 잘 알려져 있다. 상기 기준과는 별개로, 본 명세서에서는 상기 Cas12f1 가이드 RNA 중 Cas12f1 단백질과 상호작용하는 부분을 통틀어 스캐폴드 영역이라 지칭한다. 상기 스캐폴드 영역은 tracrRNA 및 crRNA의 일부를 포함하는 영역으로, Cas12f1 단백질과 상호작용하는 기능을 한다. 이에 대한 구체적인 설명은 이하 해당 단락에서 기술한다.

[190] 상기 Cas12f1 가이드 RNA는 tracrRNA의 일부(tracrRNA anti-repeat), 및 crRNA 반복 부분(crRNA repeat)의 일부가 상보적으로 결합하여 듀플렉스(duplex)를 이루고 있는 구조를 2개 포함하며, 이를 편의상 crRNA repeat-tracrRNA anti-repeat(R:AR) 부분으로 명명한다. 상기 Stem 5(R:AR2), 및 PK(R:AR1)는 이러한 crRNA repeat-tracrRNA anti-repeat 듀플렉스 구조를 이루고 있다. CRISPR/Cas12f1 복합체에서, 상기 Cas12f1 가이드 RNA 중 Stem 1 부분, Stem 2 중 일부, 및 Stem 5(R:AR2) 부분은 상기 Cas12f1 이량체와 상호작용하지 않는 부분임이 밝혀졌으며, 이를 disordered region이라 한다.

[191]

[192] 배경기술 - CRISPR/Cas 시스템 발현 벡터 설계

[193] 벡터 설계 개괄

[194] CRISPR/Cas 시스템을 유전자 편집에 사용하기 위해서, 상기 CRISPR/Cas 시스템의 각 구성을 암호화하는 서열을 가지는 벡터를 세포 내에 도입시켜, 세포 내에서 상기 CRISPR/Cas 시스템의 각 구성이 발현되도록 하는 방법이 널리 이용되고 있다. 이하, CRISPR/Cas 시스템이 세포 내에서 발현되도록 하는 벡터의 구성 요소에 대해 설명한다.

[195] CRISPR/Cas 시스템 구성 요소를 암호화하는 핵산

[196] 상기 벡터의 목적은 CRISPR/Cas 시스템 각 구성요소를 세포 내에서 발현되도록 하는 것이므로, 상기 벡터의 서열은 CRISPR/Cas 시스템의 각 구성요소를 암호화하는 핵산 중 하나 이상을 포함할 수 있다. 구체적으로, 상기

백터의 서열은 발현하고자 하는 CRISPR/Cas 시스템에 포함된 가이드 RNA, 및/또는 Cas 단백질을 암호화하는 핵산 서열을 포함한다. 이때, 상기 백터의 서열은 야생형의 가이드 RNA 및 야생형의 Cas 단백질을 암호화하는 핵산 뿐 아니라 그 목적에 따라 엔지니어링 된 Cas12f1 가이드 RNA 및 코돈 최적화된 Cas 단백질을 암호화하는 핵산 또는 엔지니어링 된 Cas 단백질을 암호화하는 핵산을 포함할 수 있다. 이때, 상기 각 구성요소를 암호화하는 핵산서열은 DNA 서열일 수 있다.

[197] 조절/제어 요소

[198] 상기 구성요소를 세포 내에서 발현시키기 위해서, 상기 백터는 하나 이상의 조절/제어 요소를 포함해야 한다. 구체적으로, 상기 조절/제어 구성요소는 프로모터, 인핸서, 인트론, 폴리아데닐화 신호, 코작 공통(Kozak consensus) 서열, 내부 리보솜 유입 부위(IRES, Internal Ribosome Entry Site), 스플라이스 엑셉터, 2A 서열 및/또는 복제원점(replication origin)을 포함할 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다. 이때, 상기 복제원점은 f1 복제원점, SV40 복제원점, pMB1 복제원점, 아데노 복제원점, AAV 복제원점, 및/또는 BBV 복제원점일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

[199] 프로모터

[200] 상기 백터의 발현 대상을 세포 내에서 발현시키려면, 각 구성 요소를 암호화하는 서열에 프로모터 서열을 작동적으로 연결시켜 세포 내에서 전사 인자가 활성화될 수 있도록 해야 한다. 상기 프로모터 서열은 대응하는 전사 인자, 또는 발현 환경에 따라 달리 설계할 수 있으며, CRISPR/Cas 시스템의 구성 요소를 세포 내에서 적절히 발현시킬 수 있는 것이라면 제한되지 않는다. 상기 프로모터 서열은 RNA 중합효소(예를 들어, RNA Pol I, Pol II, 또는 Pol III)의 활성을 촉진시키는 프로모터일 수 있다. 예를 들어, 상기 프로모터는 SV40 초기 프로모터, mouse mammary tumor virus long terminal repeat(LTR) 프로모터, adenovirus major late 프로모터 (Ad MLP), herpes simplex virus (HSV) 프로모터, CMV immediate early promoter region (CMVIE)와 같은 cytomegalovirus (CMV) 프로모터, rous sarcoma virus (RSV) 프로모터, human U6 small nuclear 프로모터 (U6) (Miyagishi et al., Nature Biotechnology 20, 497 - 500 (2002)), enhanced U6 프로모터 (e.g., Xia et al., Nucleic Acids Res. 2003 Sep 1;31(17)), human H1 프로모터 (H1), 및 7SK 중 하나 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

[201] 종결 신호

[202] 상기 전사 인자의 전사 활동의 종결을 유도하는 서열을 종결 신호라고 일컫는다. 상기 종결 신호는, 프로모터 서열의 종류에 따라 달라질 수 있다. 예를 들어, 상기 프로모터가 U6, 또는 H1 프로모터일 경우, 상기 프로모터는 티미딘 연속 서열(예를 들어, TTTTTT (T6) 서열)을 종결 신호로 인식한다.

[203] 부가 발현 요소

[204] 상기 백터는 야생형의 CRISPR/Cas 시스템 구성, 및/또는 엔지니어링 된

CRISPR/Cas 시스템 외 통상의 기술자가 필요에 의해 발현시키고자 하는 부가 발현 요소를 암호화하는 핵산 서열을 포함하고 있을 수 있다. 예를 들어, 상기 부가 발현 요소는, "태그" 단락에서 설명된 태그 중 하나일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다. 예를 들어, 상기 부가 발현 요소는, 선별을 위한 selection 마커 등 목적하는 추가 기능을 가질 수 있는 유전자, 예를 들어, 글리포세이트(glyphosate), 글루포시네이트암모늄 (glufosinate ammonium) 또는 포스피노트리신(phosphinothricin)과 같은 제초제 저항성 유전자, 암피실린(ampicillin), 카나마이신(kanamycin), G418, 블레오마이신 (Bleomycin), 하이그로마이신(hygromycin), 클로람페니콜(chloramphenicol)과 같은 항생제 내성 유전자일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

[205] 발현 벡터의 형태

[206] 상기 발현 벡터는 선형, 또는 원형 벡터 형태로 설계될 수 있다.

[207]

[208] 종래 기술의 한계점

[209] CRISPR/Cas12f1 시스템은 상대적으로 크기가 작기 때문에, 유전자 편집 기술에 적용하기 매력적인 시스템으로, 최초로 보고된 이후(Harrington et al., Programmed DNA destruction by miniature CRISPR-Cas14 enzymes, Science 362, 839-842 (2018)) 이에 대한 몇몇 연구가 진행되고 있다(Harrington et al., Programmed DNA destruction by miniature CRISPR-Cas14 enzymes, Science 362, 839-842 (2018), US 2020/0190494 A1). 하지만, 세포(예를 들어, 진핵 세포) 내에서 유전자 편집 활성이 나타나지 않거나, 지나치게 낮아 이를 활용하는 데 걸림돌이 되고 있다.

[210] 계속된 연구로 최근 선행문헌(Takeda et al., Structure of the miniature type V-F CRISPR-Cas effector enzyme, Molecular Cell 81, 1-13 (2021))에서는 CRISPR/Cas12f1 시스템에서 Cas12f1 단백질이 이량체(dimer)를 형성한다는 사실, 및 가이드 RNA의 구조에 대해 밝혔다. 상기 선행문헌에 의해 가이드 RNA 부분 중 Cas12f1 단백질과 직접적으로 상호작용하지 않는, 이른바 disordered region이 있다는 것이 밝혀졌으며, 또 다른 선행문헌(Xiao et al., Structural basis for the dimerization-dependent CRISPR-Cas12f nuclease, bioRxiv (2020))에서는 상기 disordered region 부분을 제거하고 in vitro에서 이중가닥 DNA 절단 효율을 살핀 바 있다. 하지만, 상기 선행 연구들은 1) 세포 내 유전자 편집 활성(예를 들어, indel 발생 효율)을 보이거나, 이를 높이는 방안에 대한 연구는 아니며, 2) disordered region을 제거한 실험은 있지만, 오히려 절단 활성이 낮아지는 것으로 보고하고 있다. 3) 더욱이, 상기 연구에서의 실험은 in vitro에서 진행한 실험으로, 세포 내 유전자 편집 활성을 나타내거나, 효율을 높이기 위한 변형이 무엇인지 밝히는 데는 실패하였다.

[211] 따라서 여전히, CRISPR/Cas12f1 시스템의 세포 내 유전자 편집 활성을 높이는 것이 중요한 과제로 남아 있다.

[212]

[213] 엔지니어링 된 Cas12f1 가이드 RNA의 특징[214] 엔지니어링 된 Cas12f1 가이드 RNA 개관

[215] 본 명세서에서는 종래 기술의 한계점을 극복하여, CRISPR/Cas12f1 시스템의 세포 내 유전자 편집 활성을 높이기 위한, 엔지니어링 된 Cas12f1 가이드 RNA를 제공한다. 상기 엔지니어링 된 Cas12f1 가이드 RNA는 자연계에서 발견되는 가이드 RNA의 구조 일부를 변형한 것이다. 상기 엔지니어링 된 Cas12f1 가이드 RNA는 Cas12f1 단백질과 상호작용하는 역할을 하는 스캐폴드 영역의 적어도 일부가 변형된 것을 특징으로 한다.

[216] 일 구현예로, 상기 엔지니어링 된 Cas12f1 가이드 RNA는 엔지니어링 된 스캐폴드 영역 및 스페이서를 포함할 수 있다. 이때, 상기 엔지니어링 된 스캐폴드 영역은 자연계에서 발견되는 가이드 RNA의 스캐폴드 영역과는 다른 것을 특징으로 한다.

[217] 엔지니어링 된 Cas12f1 가이드 RNA의 특징 - 스캐폴드 영역(scaffold region) 중 하나 이상의 부분(part)이 변형된

[218] 본 명세서에서 제공하는 엔지니어링 된 Cas12f1 가이드 RNA는 자연계에서 발견되는 가이드 RNA와 비교하여, 그 스캐폴드 영역의 일부가 변형된 것을 특징으로 한다. 스캐폴드 영역은 tracrRNA 및 crRNA의 일부를 포함하는 영역으로, Cas12f1 단백질과 상호작용하는 기능을 한다. 상기 스캐폴드 영역에 대해서는 이하 더 자세히 설명할 것이다.

[219] 일 구현예로, 상기 엔지니어링 된 Cas12f1 가이드 RNA는 엔지니어링 된 스캐폴드 영역을 포함할 수 있다. 이때, 상기 엔지니어링 된 스캐폴드 영역은 자연계에서 발견되는 가이드 RNA의 스캐폴드 영역이 변형된 것이다. 따라서, 상기 엔지니어링 된 스캐폴드 영역은 자연계에서 발견되는 가이드 RNA의 스캐폴드 영역과는 상이한 서열을 가진다. 일 구현예로, 상기 엔지니어링 된 스캐폴드 영역은 자연계에서 발견되는 가이드 RNA의 스캐폴드 영역 중 일부 영역이 제거된 것일 수 있다. 일 구현예로, 상기 엔지니어링 된 스캐폴드 영역은 자연계에서 발견되는 가이드 RNA의 스캐폴드 영역에 포함된 특정 부분에서, 하나 이상의 뉴클레오타이드가 제거된 것일 수 있다.

[220] 엔지니어링 된 Cas12f1 가이드 RNA의 효과

[221] 본 명세서에서 제공하는 엔지니어링 된 Cas12f1 가이드 RNA를 CRISPR/Cas12f1 시스템에 사용하는 경우, 자연계에서 발견되는 가이드 RNA를 사용하는 경우에 비해 세포 내에서 유전자 편집 활성이 극적으로 향상되는 효과가 나타난다. 본 발명자들은 실험을 통해, 자연계에서 발견되는 가이드 RNA에 어떤 구성을 추가해야 하는지, 혹은 그 스캐폴드 영역에 어떤 변형을 가해야 유전자 편집 효율이 향상되는지 상세하게 밝혔다. 상기 엔지니어링 된 Cas12f1 가이드 RNA를 사용하면 전술한 종래 기술의 한계점을 극복하여 세포 내에서 높은 효율로 유전자를 편집할 수 있다. 또한, 상기 엔지니어링 된 Cas12f1

가이드 RNA는 자연계에서 발견되는 가이드 RNA와 길이가 동등하거나, 더 짧은 길이를 가져 유전자 편집 기술 분야에서 응용 가능성이 높다. 본 출원의 엔지니어링 된 Cas12f1 가이드 RNA는 CRISPR/Cas12f1 시스템의 장점 (예를 들어, 크기가 매우 작다는 장점)을 충분히 유전자 편집 기술에 활용할 수 있게 한다.

[222] 엔지니어링 된 Cas12f1 가이드 RNA의 용도

[223] 본 명세서에서 제공하는 엔지니어링 된 Cas12f1 가이드 RNA는 Cas12f1 단백질과 함께 유전자 편집 및/또는 유전자 치료제 용도로 사용될 수 있다. 또한, 상기 엔지니어링 된 Cas12f1 가이드 RNA는 유전자 편집용 조성물을 제조하기 위한 용도로 사용할 수 있다.

[224]

[225] 용어의 설명 - Cas12f1 가이드 RNA의 부분을 지칭하는 용어

[226] Cas12f1 가이드 RNA의 부분 - 개관

[227] 자연계에서 발견되는 Cas12f1 가이드 RNA는 tracrRNA 및 crRNA로 나뉘며, 상기 crRNA는 다시 crRNA 반복 서열 부분 및 스페이서로 나눌 수 있다는 것이 통상의 기술자에게 잘 알려져 있다.

[228] 상기 기준과는 별개로, 본 명세서에서는 상기 Cas12f1 가이드 RNA 중 Cas12f1 단백질과 상호작용하는 부분을 통틀어 스캐폴드 영역이라 지칭한다. 상기 스캐폴드 영역은 tracrRNA 및 crRNA의 일부를 포함하며, 반드시 한 분자의 RNA를 지칭하는 것은 아니다. 상기 스캐폴드 영역은 다시 제1 영역, 제2 영역, 제3 영역, 제4 영역, 제5 영역, 및 제6 영역으로 세분화될 수 있다(도 1). 상기 세분화된 영역을 tracrRNA, crRNA 상에서 서술하면, 상기 제1 영역 내지 제4 영역은 tracrRNA에 포함되고, 상기 제5 영역 내지 상기 제6 영역은 crRNA, 구체적으로 crRNA 반복 서열 부분에 포함된다.

[229] 이하 서술되는 "제n 영역", 또는 "자연계에서 발견되는 제n 영역" (n은 1 이상 6이하의 정수)은 기본적으로 자연계에서 발견되는 Cas12f1 가이드 RNA의 각 부분을 지칭한다. 구체적으로, 상기 "제 n 영역"은 원핵세포 내에서 전사된 가이드 RNA의 구조, 및/또는 원핵세포 시스템에서 실제 작동하는 가이드 RNA(원핵세포 내에서 전사된 형태가 아닌, 활성화된 형태)의 구조에 대응하여 각 영역을 지칭할 수 있다. 엔지니어링 된 Cas12f1 가이드 RNA 내 상기 분류 기준과 대응되는 영역은 일반적으로 "변형된 제n 영역" 내지 "엔지니어링 된 스캐폴드 영역의 제n 영역"으로 서술된다.

[230] 다만, 엔지니어링 된 스캐폴드 영역에 포함된 제n 영역일지라도, 달리 변형되지 않아 자연계에서 발견되는 제n 영역과 동일한 경우가 있을 수 있는데, 그 때에 한해 "제n 영역"이라는 용어는 혼용될 수 있다. 이때, 상기 "제n 영역"이 지칭하는 대상(예를 들어, 엔지니어링 된 Cas12f1 가이드 RNA에 포함된 영역인지, 자연계에서 발견되는 가이드 RNA에 포함된 영역인지 여부)은 문맥에 따라 적절히 해석되어야 한다.

[231] tracrRNA, crRNA

[232] 본 명세서에서 "tracrRNA", "crRNA"라고 쓰는 경우, CRISPR/Cas 기술 분야에서 통상의 기술자가 인식할 수 있는 의미를 모두 포함한다. 이는, 자연계에서 발견되는 듀얼 가이드 RNA의 각 분자를 지칭하는 용어로 사용되는 것이 일반적이지만, 상기 tracrRNA 및 crRNA를 링커로 연결한 싱글 가이드 RNA의 각 해당 부분을 지칭하는데도 사용될 수 있다. 달리 서술하지 않는 한, tracrRNA 및 crRNA라고만 기재하는 경우 CRISPR/Cas12f1 시스템을 구성하는 tracrRNA 및 crRNA를 의미한다.

[233] 일 구현예로, tracrRNA의 서열은

5'-CUUCACUGAUAAAGUGGAGAACCGCUUCACCAAAAGCUGUCCCUUAGG
GGAUUAGAACUUGAGUGAAGGUGGGCUGCUUGCAUCAGCCUAAUGUCGA
GAAGUGCUUUCUUCGGAAAGUAACCCUCGAAACAAAUUCAUUU-3'

(서열번호 1) 또는

5'-CUUCACUGAUAAAGUGGAGAACCGCUUCACCAAAAGCUGUCCCUUAGG
GGAUUAGAACUUGAGUGAAGGUGGGCUGCUUGCAUCAGCCUAAUGUCGA
GAAGUGCUUUCUUCGGAAAGUAACCCUCGAAACAAAUUCAUUUUUCCUC
UCCAAUUCUGCACAA-3' (서열번호 2)일 수 있다. 일 구현예로, 상기

tracrRNA는 제1 영역, 제2 영역, 제3 영역, 및 제4 영역을 포함한다. 일 구현예로, 상기 tracrRNA는 5'말단에서 3'말단 방향으로, 제1 영역, 제2 영역, 제3 영역, 및 제4 영역이 순서대로 연결된 것이다.

[234] 일 구현예로, crRNA의 서열은 crRNA 반복 서열 및 스페이서 서열을 포함한다.

이때, 상기 crRNA 반복 서열은 5'-GAAUGAAGGAAUGCAAC-3' (서열번호 3)

또는 5'-GUUGCAGAACCCGAAUAGACGAAUGAAGGAAUGCAAC-3'

(서열번호 4)일 수 있다. 상기 crRNA 반복 서열은 제5 영역, 및 제6 영역을

포함한다. 상기 스페이서 서열은 표적 서열에 따라 달라질 수 있으며,

일반적으로 10 내지 50개의 뉴클레오타이드를 포함한다. 일 구현예로, 상기

crRNA는 5'말단에서 3'말단 방향으로, 제5 영역, 제6 영역, 및 스페이서가 순서대로 연결된 것이다.

[235] 스캐폴드 영역 - 개괄

[236] 본 명세서에서 "스캐폴드 영역"이라고 쓰는 경우, 자연계에서 발견되는 가이드 RNA의 부분 중 스페이서를 제외한 나머지 부분을 통틀어 지칭한다. 구체적으로, 상기 스캐폴드 영역은 tracrRNA, 및 crRNA의 일부를 포함한다. 구체적으로, 상기 crRNA의 일부는 crRNA 반복 서열 부분일 수 있다. 상기 스캐폴드 영역은 일반적으로 Cas 단백질과 상호작용할 수 있는 부분으로 알려져있다. 본 명세서에서는 상기 스캐폴드 영역을 제1 영역 내지 제6 영역으로 나누어 서술하며, 각 영역에 대해서는 이하 더 자세히 설명한다.

[237] 스캐폴드 영역 1 - 제1 영역

[238] 본 명세서에서 "제1 영역"이라고 쓰는 경우, tracrRNA의 5'말단을 포함하는

영역을 지칭한다. 상기 제1 영역은 CRISPR/Cas12f1 복합체 내에서 Stem 구조를 형성하는 뉴클레오타이드를 포함하고, 이와 인접한 뉴클레오타이드를 포함할 수 있다.

[239] 상기 제1 영역은 Stem 1 부분(Takeda et al., Structure of the miniature type V-F CRISPR-Cas effector enzyme, Molecular Cell 81, 1-13 (2021))을 포함한다. 상기 제1 영역은 상기 Stem 1 부분과 인접한 하나 이상의 뉴클레오타이드를 포함할 수 있다.

[240] 상기 제1 영역은 CRISPR/Cas12f1 복합체에서, Cas12f1 단백질과 상호작용하지 않는 disordered region을 포함한다.

[241] 일 구현예로, 상기 제1 영역은 서열번호 1 또는 2로 표현되는 tracrRNA의 5'말단으로부터 1번째 뉴클레오타이드부터 11번째 뉴클레오타이드까지를 의미할 수 있다. 일 구현예로, 상기 제1 영역의 서열은 5'-CUUCACUGAUAAGUGGAGAA-3' (서열번호 9)일 수 있다.

[242] 스캐폴드 영역 2 - 제2 영역

[243] 본 명세서에서 "제2 영역"이라고 쓰는 경우, tracrRNA 내 상기 제1 영역의 3'말단 방향에 위치한 영역을 지칭한다. 상기 제2 영역은 CRISPR/Cas12f1 복합체 내에서 Stem 구조를 형성하는 뉴클레오타이드를 포함하고, 이와 인접한 뉴클레오타이드를 포함할 수 있다. 이때, 상기 Stem 구조는 상기 제1 영역에 포함된 Stem과는 다른 것이다.

[244] 상기 제2 영역은 Stem 2 부분(Takeda et al., Structure of the miniature type V-F CRISPR-Cas effector enzyme, Molecular Cell 81, 1-13 (2021))을 포함한다. 상기 제2 영역은 상기 Stem 2 부분과 인접한 하나 이상의 뉴클레오타이드를 포함할 수 있다.

[245] 상기 제2 영역은 CRISPR/Cas12f1 복합체에서, 이량체를 이루는 하나의 Cas12f1 단백질의 RuvC 도메인, 및/또는 이량체 이루는 다른 하나의 Cas12f1 단백질의 RuvC 도메인과 상호작용하는 하나 이상의 뉴클레오타이드를 포함할 수 있다. 상기 제2 영역은 CRISPR/Cas12f1 복합체에서, Cas12f1 단백질과 상호작용하지 않는 disordered region을 포함한다.

[246] 일 구현예로, 상기 제2 영역은 서열번호 1 또는 2로 표현되는 tracrRNA의 5'말단으로부터 22번째 뉴클레오타이드부터 71번째 뉴클레오타이드까지를 의미할 수 있다. 일 구현예로, 상기 제2 영역의 서열은 5'-CCGCUUCACCAAAGCUGUCCCUUAGGGGAUUAGAACUUGAGUGAAG GUG-3' (서열번호 10)일 수 있다.

[247] 스캐폴드 영역 3 - 제3 영역

[248] 본 명세서에서 "제3 영역"이라고 쓰는 경우, tracrRNA 내 상기 제2 영역의 3'말단 방향에 위치한 영역을 지칭한다. 상기 제3 영역은 CRISPR/Cas12f1 복합체 내에서 Stem 구조를 형성하는 뉴클레오타이드, 및 crRNA에 포함된 일부 뉴클레오타이드와 상보적인 결합을 형성하고 있는 뉴클레오타이드를 포함하고,

이와 인접한 뉴클레오타이드를 포함할 수 있다.

- [249] 상기 제3 영역은 Stem 4 부분(Takeda et al., Structure of the miniature type V-F CRISPR-Cas effector enzyme, Molecular Cell 81, 1-13 (2021)) 및 Stem 3-PK (R:AR-1) 부분 중 tracrRNA에 속한 뉴클레오타이드(Takeda et al., Structure of the miniature type V-F CRISPR-Cas effector enzyme, Molecular Cell 81, 1-13 (2021))를 포함한다. 상기 제3 영역은 상기 Stem 4 부분 및/또는 Stem 3-PK (R:AR-1) 부분 중 tracrRNA에 속한 뉴클레오타이드와 인접한 하나 이상의 뉴클레오타이드를 포함할 수 있다.
- [250] 상기 제3 영역은 CRISPR/Cas12f1 복합체에서, 이량체를 이루는 하나의 Cas12f1 단백질의 WED 도메인, 및/또는 RuvC 도메인과 상호작용하는 하나 이상의 뉴클레오타이드를 포함한다. 이때, 상기 뉴클레오타이드는 Stem 3-PK (R:AR-1) 부분 중 tracrRNA에 속한 뉴클레오타이드일 수 있다.
- [251] 상기 제3 영역은 CRISPR/Cas12f1 복합체에서, 이량체를 이루는 하나의 Cas12f1 단백질의 RuvC 도메인 및/또는 이량체를 이루는 다른 하나의 Cas12f1 단백질의 REC 도메인과 상호작용하는 하나 이상의 뉴클레오타이드를 포함한다. 이때, 상기 뉴클레오타이드는 Stem 4 부분에 포함된 뉴클레오타이드일 수 있다.
- [252] 상기 제3 영역은 crRNA의 제6 영역에 포함된 하나 이상의 뉴클레오타이드와 상보적으로 결합하는 하나 이상의 뉴클레오타이드를 포함한다.
- [253] 일 구현예로, 상기 제3 영역은 서열번호 1 또는 2로 표현되는 tracrRNA의 5'말단으로부터 72번째 뉴클레오타이드부터 127번째 뉴클레오타이드까지를 의미할 수 있다. 일 구현예로, 상기 제3 영역의 서열은 5'-GGCUGCUUGCAUCAGCCUAAUGUCGAGAAGUGCUUUCUUCGGAAAGU AACCCUCGA-3' (서열번호 11일) 수 있다.
- [254] 스캐폴드 영역 4 - 제4 영역
- [255] 본 명세서에서 "제4 영역"이라고 쓰는 경우, tracrRNA의 제3 영역의 3'말단 방향에 위치한 영역을 지칭한다. 상기 제4 영역은 CRISPR/Cas12f1 복합체 내에서 crRNA에 포함된 일부 뉴클레오타이드와 상보적인 결합을 형성할 수 있는 뉴클레오타이드를 포함하고, 이와 인접한 뉴클레오타이드를 포함할 수 있다.
- [256] 상기 제4 영역은 Stem 5 (R:AR-2) 중 tracrRNA에 속한 뉴클레오타이드를 포함한다(Takeda et al., Structure of the miniature type V-F CRISPR-Cas effector enzyme, Molecular Cell 81, 1-13 (2021)). 상기 제4 영역은 상기 Stem 5 (R:AR-2) 중 tracrRNA에 속한 뉴클레오타이드와 인접한 하나 이상의 뉴클레오타이드를 포함할 수 있다.
- [257] 상기 제4 영역은 CRISPR/Cas12f1 복합체에서, 이량체를 이루는 하나의 Cas12f1 단백질의 WED 도메인, 및/또는 ZF 도메인과 상호작용하는 하나 이상의 뉴클레오타이드를 포함할 수 있다. 이때 상기 뉴클레오타이드는 Stem 5 (R:AR-2) 중 tracrRNA에 속한 뉴클레오타이드일 수 있다.

- [258] 상기 제4 영역은 crRNA의 제5 영역에 포함된 하나 이상의 뉴클레오타이드와 상보적으로 결합하는 하나 이상의 뉴클레오타이드를 포함할 수 있다. 상기 제4 영역은 CRISPR/Cas12f1 복합체에서, Cas12f1 단백질과 상호작용하지 않는 disordered region을 포함한다.
- [259] 일 구현예로, 상기 제4 영역은 서열번호 1으로 표현되는 tracrRNA의 5'말단으로부터 128번째 뉴클레오타이드부터 140번째 뉴클레오타이드까지를 의미할 수 있다. 일 구현예로, 상기 제4 영역은 서열번호 2으로 표현되는 tracrRNA의 5'말단으로부터 128번째 뉴클레오타이드부터 162번째 뉴클레오타이드까지를 의미할 수 있다.
- [260] 일 구현예로, 상기 제4 영역의 서열은 5'-AACAAAUUCAUUU-3' (서열번호 12) 또는 5'-AACAAAUUCAUUUUUCCUCUCCAAUUCUGCACAA-3' (서열번호 13일) 수 있다.
- [261] 스캐폴드 영역 5 - 제5 영역
- [262] 본 명세서에서 "제5 영역"이라고 쓰는 경우, crRNA 5'말단을 포함하는 영역을 지칭한다. 상기 제5 영역은 CRISPR/Cas12f1 복합체 내에서 상기 제4 영역의 하나 이상의 뉴클레오타이드와 상보적인 결합을 형성하는 뉴클레오타이드를 포함하며, 이와 인접한 뉴클레오타이드를 포함할 수 있다.
- [263] 상기 제5 영역은 Stem 5 (R:AR-2) 부분 중 crRNA에 속한 뉴클레오타이드를 포함한다(Takeda et al., Structure of the miniature type V-F CRISPR-Cas effector enzyme, Molecular Cell 81, 1-13 (2021)). 상기 제5 영역은 상기 Stem 5 (R:AR-2) 부분 중 crRNA에 속한 뉴클레오타이드와 인접한 하나 이상의 뉴클레오타이드를 포함할 수 있다.
- [264] 상기 제5 영역은 CRISPR/Cas12f1 복합체에서, 이량체를 이루는 하나의 Cas12f1 단백질의 WED 도메인, REC 도메인 및/또는 ZF 도메인과 상호작용하는 하나 이상의 뉴클레오타이드를 포함할 수 있다. 이때 상기 뉴클레오타이드는 Stem 5 (R:AR-2) 중 crRNA에 속한 뉴클레오타이드일 수 있다.
- [265] 상기 제5 영역은 상기 제4 영역에 포함된 하나 이상의 뉴클레오타이드와 상보적으로 결합하는 하나 이상의 뉴클레오타이드를 포함할 수 있다. 상기 제5 영역은 CRISPR/Cas12f1 복합체에서, Cas12f1 단백질과 상호작용하지 않는 disordered region을 포함한다.
- [266] 일 구현예로, 상기 제5 영역은 서열번호 3로 표현되는 crRNA의 5'말단으로부터 1번째 뉴클레오타이드부터 10번째 뉴클레오타이드까지를 의미할 수 있다. 일 구현예로, 상기 제5 영역은 서열번호 4로 표현되는 crRNA의 5'말단으로부터 1번째 뉴클레오타이드부터 30번째 뉴클레오타이드까지를 의미할 수 있다. 일 구현예로, 상기 제5 영역의 서열은 5'-GAAUGAAGGA-3' (서열번호 14) 또는 5'-GUUGCAGAACCCGAAUAGACGAAUGAAGGA-3' (서열번호 15)일 수 있다.
- [267] 스캐폴드 영역 6 - 제6 영역
- [268] 본 명세서에서 "제6 영역"이라고 쓰는 경우, crRNA 내 상기 제5 영역의 3'말단

방향에 위치한 영역을 지칭한다. 상기 제6 영역은 CRISPR/Cas12f1 복합체 내에서 상기 제3 영역의 하나 이상의 뉴클레오타이드와 상보적인 결합을 형성하는 뉴클레오타이드를 포함하며, 이와 인접한 뉴클레오타이드를 포함할 수 있다.

- [269] 상기 제6 영역은 PK (R:AR-1) 부분 중 crRNA에 속한 뉴클레오타이드를 포함한다(Takeda et al., Structure of the miniature type V-F CRISPR-Cas effector enzyme, Molecular Cell 81, 1-13 (2021)). 상기 제6 영역은 상기 PK (R:AR-1) 부분 중 crRNA에 속한 뉴클레오타이드와 인접한 하나 이상의 뉴클레오타이드를 포함할 수 있다.
- [270] 상기 제6 영역은 CRISPR/Cas12f1 복합체에서, 이량체를 이루는 하나의 Cas12f1 단백질의 WED 도메인, ZF 도메인 및/또는 RuvC 도메인과 상호작용하는 하나 이상의 뉴클레오타이드를 포함한다. 이때, 상기 뉴클레오타이드는 Stem 3-PK (R:AR-1) 부분 중 crRNA에 속한 뉴클레오타이드일 수 있다.
- [271] 일 구현예로, 상기 제6 영역은 서열번호 3로 표현되는 crRNA의 5'말단으로부터 11번째 뉴클레오타이드부터 17번째 뉴클레오타이드까지를 의미할 수 있다. 일 구현예로, 상기 제6 영역은 서열번호 4로 표현되는 crRNA의 5'말단으로부터 31번째 뉴클레오타이드부터 37번째 뉴클레오타이드까지를 의미할 수 있다. 일 구현예로, 상기 제6 영역의 서열은 5'-AUGCAAC-3'일 수 있다.
- [272] 스페이서
- [273] 본 명세서에서 "스페이서"라 쓰는 경우, CRISPR/Cas12f1 시스템에서 표적 서열 부분과 혼성화되는 하나 이상의 뉴클레오타이드를 지칭한다. 상기 스페이서는, CRISPR/Cas12f1 시스템에서 가이드 RNA의 crRNA의 3'말단 부근의 10개 내지 50개의 연속된 뉴클레오타이드를 지칭한다. 상기 스페이서는 CRISPR/Cas12f1 시스템을 사용하여 편집하고자 하는 표적 핵산의 표적 서열에 대응하여 설계된다. 달리 표현하면, 상기 스페이서는 표적 핵산의 표적 서열에 따라 다양한 서열을 가질 수 있다.
- [274]
- [275] 엔지니어링 된 스캐폴드 영역 - 개괄
- [276] 엔지니어링 된 스캐폴드 영역 개괄
- [277] 본 명세서에서는 CRISPR/Cas12f1 시스템의 유전자 편집 효율 향상을 위해 도입할 수 있는 엔지니어링 된 스캐폴드 영역을 제공한다. 상기 엔지니어링 된 스캐폴드 영역은 엔지니어링 된 Cas12f1 가이드 RNA가 사용된 CRISPR/Cas12f1 시스템의 유전자 편집 효율을 향상시킨다. 상기 엔지니어링 된 스캐폴드 영역은 자연계에서 발견되는 Cas12f1 가이드 RNA의 스캐폴드 영역(이하, 자연계에서 발견되는 스캐폴드 영역)에서 한 군데 이상이 변형되어, 이와는 다른 서열 및/또는 구조를 가지게 된 것이 특징이다.
- [278] 이때, 상기 엔지니어링 된 스캐폴드 영역의 기능은 자연계에서 발견되는 스캐폴드 영역과 동일하거나, 유사한 기능을 가진다. 구체적으로, 상기

엔지니어링 된 스캐폴드 영역은 CRISPR/Cas12f1 복합체의 Cas12f1 단백질 이량체와 상호작용하는 기능을 가진다.

[279] 상기 엔지니어링 된 스캐폴드 영역은 자연계에서 발견되는 스캐폴드 영역의 각 부분에 대응하는 영역을 포함한다. 구체적으로, 상기 엔지니어링 된 스캐폴드 영역은 제1 영역, 제2 영역, 제3 영역, 제4 영역, 제5 영역, 및 제6 영역을 포함하며, 이는 자연계에서 발견되는 스캐폴드 영역에 포함된 제1 영역 내지 제6 영역에 각각 대응된다.

[280] 싱글 가이드 RNA를 만들기 위한 변형

[281] 본 명세서에서 제공하는 엔지니어링 된 Cas12f1 가이드 RNA는 한 분자의 싱글 가이드 RNA일 수 있다. 따라서, 본 명세서에서 제공하는 엔지니어링 된 스캐폴드 영역은 각 영역 중 하나 이상이 변형된 것이고, 추가적으로 tracrRNA 제4 영역의 3'말단 및 crRNA 제5 영역의 5' 말단이 링커를 통해 연결된 것일 수 있다.

[282] 일 구현예로, 상기 엔지니어링 된 스캐폴드 영역은 자연계에서 발견되는 스캐폴드 영역에서 한 군데 이상이 변형되고, 상기 제4 영역의 3'말단 및 상기 제5 영역의 5'말단이 링커를 통해 연결된 것일 수 있다. 예를 들어, 상기 링커는 5'-GAAA-3'일 수 있다.

[283]

[284] 엔지니어링 된 스캐폴드 영역 1- 제1 영역 변형

[285] 제1 영역 변형 개관

[286] 본 명세서에서 제공하는 엔지니어링 된 스캐폴드 영역은 자연계에서 발견되는 스캐폴드 영역에서 제1 영역이 변형된 것일 수 있다.

[287] 일 구현예로, 상기 엔지니어링 된 스캐폴드 영역은 변형된 제1 영역을 포함할 수 있다. 이때, 상기 변형된 제1 영역은 자연계에서 발견되는 스캐폴드 영역의 제1 영역에서 하나 이상의 뉴클레오타이드가 제거된 것이다. 이때, 상기 제거된 뉴클레오타이드는 CRISPR/Cas12f1 복합체에서 Stem 구조를 형성하는 영역에서 선택된 뉴클레오타이드이다.

[288] 일 구현예로, 상기 엔지니어링 된 Cas12f1 가이드 RNA에 포함된 엔지니어링 된 스캐폴드 영역은, 자연계에서 발견되는 제1 영역에 포함된 하나 이상의 뉴클레오타이드가 제거된 것일 수 있으며, 선택적으로, 상기 제1영역 외 다른 부분도 변형된 것을 추가로 포함할 수 있다. 일 구현예로, 상기 제거된 뉴클레오타이드는 상기 자연계에서 발견되는 제1 영역 중 CRISPR/Cas12f1 복합체에서 Stem 구조를 형성하는 부분에 포함된 뉴클레오타이드일 수 있다. 일 구현예로, 상기 제거된 뉴클레오타이드는 상기 자연계에서 발견되는 제1 영역 중 Stem 1 (Takeda et al., Structure of the miniature type V-F CRISPR-Cas effector enzyme, Molecular Cell 81, 1-13 (2021))에 속하는 뉴클레오타이드일 수 있다. 일 구현예로, 상기 제거된 뉴클레오타이드는 상기 자연계에서 발견되는 제1 영역 중 CRISPR/Cas12f1 복합체에서 Cas12f1 단백질과 상호작용하지 않는

뉴클레오타이드일 수 있다.

[289] 일 구현예로, 상기 변형된 제1 영역은 3'말단 방향에 5'-A-3' 서열을 포함하는 것을 특징으로 한다.

[290] 일 구현예로, 상기 엔지니어링 된 스캐폴드 영역은 자연계에서 발견되는 스캐폴드 영역 중 제1 영역이 제거된 것일 수 있다. 달리 표현해, 상기 엔지니어링 된 스캐폴드 영역은 자연계에서 발견되는 스캐폴드 영역 중 제1 영역과 대응되는 영역을 포함하지 않을 수 있다.

[291] 제1 영역 변형 내용 - 일부 뉴클레오타이드 제거

[292] 상기 엔지니어링 된 스캐폴드 영역의 제1 영역은 자연계에서 발견되는 스캐폴드 영역의 제1 영역에서 하나 이상의 뉴클레오타이드가 제거된 것일 수 있다.

[293] 일 구현예로, 상기 엔지니어링 된 스캐폴드 영역의 변형된 제1 영역은 자연계에서 발견되는 스캐폴드 영역의 제1 영역에서 5'말단의 1개 내지 20개의 뉴클레오타이드가 제거된 것일 수 있다. 일 구현예로, 상기 변형된 제1 영역은 자연계에서 발견되는 스캐폴드 영역의 제1 영역에서 5'말단의 1개, 2개, 3개, 4개, 5개, 6개, 7개, 8개, 9개, 10개, 11개, 12개, 13개, 14개, 15개, 16개, 17개, 18개, 19개, 또는 20개의 연속된 뉴클레오타이드가 제거된 것일 수 있다. 일 구현예로, 상기 변형된 제1 영역은 자연계에서 발견되는 스캐폴드 영역의 제1 영역에서 5'말단에서 바로 이전 문장에서 선택된 두 개의 수치범위 내 연속된 뉴클레오타이드가 제거된 것일 수 있다. 예를 들어, 자연계에서 발견되는 스캐폴드 영역의 제1 영역에서 5'말단의 1개 내지 3개의 연속된 뉴클레오타이드가 제거된 것일 수 있다.

[294] 일 구현예로, 상기 변형된 제1 영역은 적어도 하나의 뉴클레오타이드를 포함하며, 이는 5'-A-3'일 수 있다.

[295] 변형된 제1 영역 서열 예시

[296] 일 구현예로, 상기 변형된 제1 영역의 서열은 5'-A-3', 5'-AA-3', 5'-GAA-3', 5'-AGAA-3', 5'-GAGAA-3', 5'-GGAGAA-3', 5'-UGGAGAA-3', 5'-GUGGAGAA-3', 5'-AGUGGAGAA-3', 5'-AAGUGGAGAA-3'(서열번호 16), 5'-AAAGUGGAGAA-3'(서열번호 17), 5'-UAAAGUGGAGAA-3'(서열번호 18), 5'-AUAAAGUGGAGAA-3'(서열번호 19), 5'-GAUAAAGUGGAGAA-3'(서열번호 20), 5'-UGAUAAAGUGGAGAA-3'(서열번호 21), 5'-CUGAUAAAGUGGAGAA-3'(서열번호 22), 5'-ACUGAUAAAGUGGAGAA-3'(서열번호 23), 5'-CACUGAUAAAGUGGAGAA-3'(서열번호 24), 5'-UCACUGAUAAAGUGGAGAA-3'(서열번호 25), 및 5'-UUCACUGAUAAAGUGGAGAA-3'(서열번호 26)에서 선택된 것일 수 있다.

[297] 일 구현예로, 제1 영역이 변형된 엔지니어링 된 스캐폴드 영역의 서열은 다음을 포함할 수 있다:

- [298] 5'말단에서 3'말단 방향으로,
- [299] 5'-A-3', 5'-AA-3', 5'-GAA-3', 5'-AGAA-3', 5'-GAGAA-3', 5'-GGAGAA-3',
5'-UGGAGAA-3', 5'-GUGGAGAA-3', 5'-AGUGGAGAA-3', 서열번호 16 내지
26으로 이루어진 군에서 선택된 서열,
- [300] 서열번호 10,
- [301] 서열번호 11, 및
- [302] 서열번호 12이 연결된 서열; 및
- [303] 5'말단에서 3'말단 방향으로, 서열번호 14 및 5'-AUGCAAC-3'가 연결된 서열.
- [304] 일 구현예로, 제1 영역이 변형된 엔지니어링 된 스캐폴드 영역의 서열은 다음을
포함할 수 있다:
- [305] 5'-ACCGCUUCACCAAAAGCUGUCCCUUAGGGGAUUAGAACUUGAGUGA
AGGUGGGCUGCUUGCAUCAGCCUAAUGUCGAGAAGUGCUUUCUUCGGAA
AGUAACCCUCGAAACAAAUUCAUUU-3'(서열번호 118),
5'-AACCGCUUCACCAAAAGCUGUCCCUUAGGGGAUUAGAACUUGAGUGA
AGGUGGGCUGCUUGCAUCAGCCUAAUGUCGAGAAGUGCUUUCUUCGGAA
AGUAACCCUCGAAACAAAUUCAUUU-3'(서열번호 119),
5'-GAACCGCUUCACCAAAAGCUGUCCCUUAGGGGAUUAGAACUUGAGUG
AAGGUGGGCUGCUUGCAUCAGCCUAAUGUCGAGAAGUGCUUUCUUCGGA
AAGUAACCCUCGAAACAAAUUCAUUU-3'(서열번호 120),
5'-AGAACCGCUUCACCAAAAGCUGUCCCUUAGGGGAUUAGAACUUGAGU
GAAGGUGGGCUGCUUGCAUCAGCCUAAUGUCGAGAAGUGCUUUCUUCGG
AAAGUAACCCUCGAAACAAAUUCAUUU-3'(서열번호 121),
5'-GAGAACCGCUUCACCAAAAGCUGUCCCUUAGGGGAUUAGAACUUGAG
UGAAGGUGGGCUGCUUGCAUCAGCCUAAUGUCGAGAAGUGCUUUCUUCG
GAAAGUAACCCUCGAAACAAAUUCAUUU-3'(서열번호 122),
5'-GGAGAACCGCUUCACCAAAAGCUGUCCCUUAGGGGAUUAGAACUUGA
GUGAAGGUGGGCUGCUUGCAUCAGCCUAAUGUCGAGAAGUGCUUUCUUC
GGAAAGUAACCCUCGAAACAAAUUCAUUU-3'(서열번호 123),
5'-UGGAGAACCGCUUCACCAAAAGCUGUCCCUUAGGGGAUUAGAACUUG
AGUGAAGGUGGGCUGCUUGCAUCAGCCUAAUGUCGAGAAGUGCUUUCUUC
CGGAAAGUAACCCUCGAAACAAAUUCAUUU-3'(서열번호 124),
5'-GUGGAGAACCGCUUCACCAAAAGCUGUCCCUUAGGGGAUUAGAACUUG
GAGUGAAGGUGGGCUGCUUGCAUCAGCCUAAUGUCGAGAAGUGCUUUCUUC
UCGGAAAGUAACCCUCGAAACAAAUUCAUUU-3'(서열번호 125),
5'-AGUGGAGAACCGCUUCACCAAAAGCUGUCCCUUAGGGGAUUAGAACU
UGAGUGAAGGUGGGCUGCUUGCAUCAGCCUAAUGUCGAGAAGUGCUUUC
UUCGGAAAGUAACCCUCGAAACAAAUUCAUUU-3'(서열번호 126),
5'-AAGUGGAGAACCGCUUCACCAAAAGCUGUCCCUUAGGGGAUUAGAAC

UUGAGUGAAGGUGGGCUGCUUGCAUCAGCCUAAUGUCGAGAAGUGCUUU
 CUUCGGAAAGUAACCCUCGAAACAAAUUCAUUU-3'(서열번호 127),
 5'-AAAGUGGAGAACCGCUUCACCAAAAGCUGUCCCUUAGGGGAUUAGAA
 CUUGAGUGAAGGUGGGCUGCUUGCAUCAGCCUAAUGUCGAGAAGUGCUU
 UCUUCGGAAAGUAACCCUCGAAACAAAUUCAUUU-3'(서열번호 128),
 5'-UAAAGUGGAGAACCGCUUCACCAAAAGCUGUCCCUUAGGGGAUUAGA
 ACUUGAGUGAAGGUGGGCUGCUUGCAUCAGCCUAAUGUCGAGAAGUGCU
 UUCUUCGGAAAGUAACCCUCGAAACAAAUUCAUUU-3'(서열번호 129),
 5'-AUAAGUGGAGAACCGCUUCACCAAAAGCUGUCCCUUAGGGGAUUAG
 AACUUGAGUGAAGGUGGGCUGCUUGCAUCAGCCUAAUGUCGAGAAGUGC
 UUUCUUCGGAAAGUAACCCUCGAAACAAAUUCAUUU-3'(서열번호 130),
 5'-GAUAAAGUGGAGAACCGCUUCACCAAAAGCUGUCCCUUAGGGGAUUA
 GAACUUGAGUGAAGGUGGGCUGCUUGCAUCAGCCUAAUGUCGAGAAGUG
 CUUUCUUCGGAAAGUAACCCUCGAAACAAAUUCAUUU-3'(서열번호 131),
 5'-UGAUAAAGUGGAGAACCGCUUCACCAAAAGCUGUCCCUUAGGGGAUU
 AGAACUUGAGUGAAGGUGGGCUGCUUGCAUCAGCCUAAUGUCGAGAAGU
 GCUUUCUUCGGAAAGUAACCCUCGAAACAAAUUCAUUU-3'(서열번호 132),
 5'-CUGAUAAAGUGGAGAACCGCUUCACCAAAAGCUGUCCCUUAGGGGAU
 UAGAACUUGAGUGAAGGUGGGCUGCUUGCAUCAGCCUAAUGUCGAGAAG
 UGCUUUCUUCGGAAAGUAACCCUCGAAACAAAUUCAUUU-3'(서열번호
 133),
 5'-ACUGAUAAAGUGGAGAACCGCUUCACCAAAAGCUGUCCCUUAGGGGA
 UUAGAACUUGAGUGAAGGUGGGCUGCUUGCAUCAGCCUAAUGUCGAGAA
 GUGCUUUCUUCGGAAAGUAACCCUCGAAACAAAUUCAUUU-3'(서열번호
 134),
 5'-CACUGAUAAAGUGGAGAACCGCUUCACCAAAAGCUGUCCCUUAGGGGA
 UUAGAACUUGAGUGAAGGUGGGCUGCUUGCAUCAGCCUAAUGUCGAGAA
 GUGCUUUCUUCGGAAAGUAACCCUCGAAACAAAUUCAUUU-3'(서열번호
 135),
 5'-UCACUGAUAAAGUGGAGAACCGCUUCACCAAAAGCUGUCCCUUAGGGG
 AUUAGAACUUGAGUGAAGGUGGGCUGCUUGCAUCAGCCUAAUGUCGAGA
 AGUGCUUUCUUCGGAAAGUAACCCUCGAAACAAAUUCAUUU-3'(서열번호
 136), 및
 5'-UUCACUGAUAAAGUGGAGAACCGCUUCACCAAAAGCUGUCCCUUAGGG
 GAUUAGAACUUGAGUGAAGGUGGGCUGCUUGCAUCAGCCUAAUGUCGAG
 AAGUGCUUUCUUCGGAAAGUAACCCUCGAAACAAAUUCAUUU-3'(서열번
 호 137)로 이루어진 군에서 선택된 서열; 및
 5'-GAAUGAAGGAAUGCAAC-3'(서열번호 3).

[306]

[307] 일 구현예로, 제1 영역이 변형된 엔지니어링 된 스캐폴드 영역의 서열은 다음을 포함할 수 있다:

[308] 5'말단에서 3'말단 방향으로,

[309] 5'-A-3', 5'-AA-3', 5'-GAA-3', 5'-AGAA-3', 5'-GAGAA-3', 5'-GGAGAA-3', 5'-UGGAGAA-3', 5'-GUGGAGAA-3', 5'-AGUGGAGAA-3', 및 서열번호 16 내지 26으로 이루어진 군에서 선택된 서열,

[310] 서열번호 10,

[311] 서열번호 11, 및

[312] 서열번호 13이 연결된 서열; 및

[313] 5'말단에서 3'말단 방향으로, 서열번호 15 및 5'-AUGCAAC-3'가 연결된 서열.

[314] 일 구현예로, 제1 영역이 변형된 엔지니어링 된 스캐폴드 영역의 서열은 5'에서 3'말단 방향으로,

[315] 5'-A-3', 5'-AA-3', 5'-GAA-3', 5'-AGAA-3', 5'-GAGAA-3', 5'-GGAGAA-3', 5'-UGGAGAA-3', 5'-GUGGAGAA-3', 5'-AGUGGAGAA-3', 및 서열번호 16 내지 26으로 이루어진 군에서 선택된 서열,

[316] 서열번호 10,

[317] 서열번호 11,

[318] 서열번호 12,

[319] 링커,

[320] 서열번호 14, 및

[321] 5'-AUGCAAC-3'가 연결된 것일 수 있다.

[322] 이때, 상기 링커는 5'-GAAA-3'일 수 있다.

[323]

[324] 일 구현예로, 제1 영역이 변형된 엔지니어링 된 스캐폴드 영역의 서열은

5'-ACCGCUUCACCAAAAAGCUGUCCCUUAGGGGAUUAGAACUUGAGUGAA
GGUGGGCUGCUUGCAUCAGCCUAAUGUCGAGAAGUGCUUUCUUCGGAAA
GUAACCCUCGAAACAAAUUCAUUUGAAAGAAUGAAGGAAUGCAAC-3'(서
열번호 167),

5'-AACCGCUUCACCAAAAAGCUGUCCCUUAGGGGAUUAGAACUUGAGUGA
AGGUGGGCUGCUUGCAUCAGCCUAAUGUCGAGAAGUGCUUUCUUCGGAA
AGUAACCCUCGAAACAAAUUCAUUUGAAAGAAUGAAGGAAUGCAAC-3'(서
열번호 168),

5'-GAACCGCUUCACCAAAAAGCUGUCCCUUAGGGGAUUAGAACUUGAGUG
AAGGUGGGCUGCUUGCAUCAGCCUAAUGUCGAGAAGUGCUUUCUUCGGA
AAGUAACCCUCGAAACAAAUUCAUUUGAAAGAAUGAAGGAAUGCAAC-3'(서
열번호 169),

5'-AGAACCGCUUCACCAAAAAGCUGUCCCUUAGGGGAUUAGAACUUGAGU

GAAGGUGGGCUGCUUGCAUCAGCCUAAUGUCGAGAAGUGCUUUCUUCGG
AAAGUAACCCUCGAAACAAAUUCAUUUGAAAGAAUGAAGGAAUGCAAC-
3'(서열번호 170),

5'-GAGAACCGCUUCACCAAAAAGCUGUCCCUUAGGGGAUUAGAACUUGAG
UGAAGGUGGGCUGCUUGCAUCAGCCUAAUGUCGAGAAGUGCUUUCUUCG
GAAAGUAACCCUCGAAACAAAUUCAUUUGAAAGAAUGAAGGAAUGCAAC
-3'(서열번호 171),

5'-GGAGAACCGCUUCACCAAAAAGCUGUCCCUUAGGGGAUUAGAACUUGA
GUGAAGGUGGGCUGCUUGCAUCAGCCUAAUGUCGAGAAGUGCUUUCUUC
GGAAAGUAACCCUCGAAACAAAUUCAUUUGAAAGAAUGAAGGAAUGCAA
C-3'(서열번호 172),

5'-UGGAGAACCGCUUCACCAAAAAGCUGUCCCUUAGGGGAUUAGAACUUG
AGUGAAGGUGGGCUGCUUGCAUCAGCCUAAUGUCGAGAAGUGCUUUCUUC
CGGAAAGUAACCCUCGAAACAAAUUCAUUUGAAAGAAUGAAGGAAUGCA
AC-3'(서열번호 173),

5'-GUGGAGAACCGCUUCACCAAAAAGCUGUCCCUUAGGGGAUUAGAACUUC
GAGUGAAGGUGGGCUGCUUGCAUCAGCCUAAUGUCGAGAAGUGCUUUCU
UCGGAAAGUAACCCUCGAAACAAAUUCAUUUGAAAGAAUGAAGGAAUGC
AAC-3'(서열번호 174),

5'-AGUGGAGAACCGCUUCACCAAAAAGCUGUCCCUUAGGGGAUUAGAACU
UGAGUGAAGGUGGGCUGCUUGCAUCAGCCUAAUGUCGAGAAGUGCUUUC
UUCGGAAAGUAACCCUCGAAACAAAUUCAUUUGAAAGAAUGAAGGAAUG
CAAC-3'(서열번호 175),

5'-AAGUGGAGAACCGCUUCACCAAAAAGCUGUCCCUUAGGGGAUUAGAAC
UUGAGUGAAGGUGGGCUGCUUGCAUCAGCCUAAUGUCGAGAAGUGCUUU
CUUCGGAAAGUAACCCUCGAAACAAAUUCAUUUGAAAGAAUGAAGGAAU
GCAAC-3'(서열번호 176),

5'-AAAGUGGAGAACCGCUUCACCAAAAAGCUGUCCCUUAGGGGAUUAGAA
CUUGAGUGAAGGUGGGCUGCUUGCAUCAGCCUAAUGUCGAGAAGUGCUU
UCUUCGGAAAGUAACCCUCGAAACAAAUUCAUUUGAAAGAAUGAAGGAA
UGCAAC-3'(서열번호 177),

5'-UAAAGUGGAGAACCGCUUCACCAAAAAGCUGUCCCUUAGGGGAUUAGA
ACUUGAGUGAAGGUGGGCUGCUUGCAUCAGCCUAAUGUCGAGAAGUGCU
UUCUUCGGAAAGUAACCCUCGAAACAAAUUCAUUUGAAAGAAUGAAGGA
AUGCAAC-3'(서열번호 178),

5'-AUAAGUGGAGAACCGCUUCACCAAAAAGCUGUCCCUUAGGGGAUUAG
AACUUGAGUGAAGGUGGGCUGCUUGCAUCAGCCUAAUGUCGAGAAGUGC
UUUCUUCGGAAAGUAACCCUCGAAACAAAUUCAUUUGAAAGAAUGAAGG

AAUGCAAC-3'(서열번호 179),

5'-GAUAAAGUGGAGAACCGCUUCACCAAAAGCUGUCCCUUAGGGGAUUA
GAACUUGAGUGAAGGUGGGCUGCUUGCAUCAGCCUAAUGUCGAGAAGUG
CUUUCUUCGGAAAGUAACCCUCGAAACAAAUUCAUUUGAAAGAAUGAAG
GAAUGCAAC-3'(서열번호 180),

5'-UGAUAAAGUGGAGAACCGCUUCACCAAAAGCUGUCCCUUAGGGGAUU
AGAACUUGAGUGAAGGUGGGCUGCUUGCAUCAGCCUAAUGUCGAGAAGU
GCUUUCUUCGGAAAGUAACCCUCGAAACAAAUUCAUUUGAAAGAAUGAA
GGAAUGCAAC-3'(서열번호 181),

5'-CUGAUAAAGUGGAGAACCGCUUCACCAAAAGCUGUCCCUUAGGGGAU
UAGAACUUGAGUGAAGGUGGGCUGCUUGCAUCAGCCUAAUGUCGAGAAG
UGC UUUCUUCGGAAAGUAACCCUCGAAACAAAUUCAUUUGAAAGAAUGA
AGGAAUGCAAC-3'(서열번호 182),

5'-ACUGAUAAAGUGGAGAACCGCUUCACCAAAAGCUGUCCCUUAGGGGA
UUAGAACUUGAGUGAAGGUGGGCUGCUUGCAUCAGCCUAAUGUCGAGAA
GUGCUUUCUUCGGAAAGUAACCCUCGAAACAAAUUCAUUUGAAAGAAUG
AAGGAAUGCAAC-3'(서열번호 183),

5'-CACUGAUAAAGUGGAGAACCGCUUCACCAAAAGCUGUCCCUUAGGGGA
UUAGAACUUGAGUGAAGGUGGGCUGCUUGCAUCAGCCUAAUGUCGAGAA
GUGCUUUCUUCGGAAAGUAACCCUCGAAACAAAUUCAUUUGAAAGAAUG
AAGGAAUGCAAC-3'(서열번호 184),

5'-UCACUGAUAAAGUGGAGAACCGCUUCACCAAAAGCUGUCCCUUAGGGG
AUUAGAACUUGAGUGAAGGUGGGCUGCUUGCAUCAGCCUAAUGUCGAGA
AGUGCUUUCUUCGGAAAGUAACCCUCGAAACAAAUUCAUUUGAAAGAAU
GAAGGAAUGCAAC-3'(서열번호 185), 및

5'-UUCACUGAUAAAGUGGAGAACCGCUUCACCAAAAGCUGUCCCUUAGGG
GAUUAGAACUUGAGUGAAGGUGGGCUGCUUGCAUCAGCCUAAUGUCGAG
AAGUGCUUUCUUCGGAAAGUAACCCUCGAAACAAAUUCAUUUGAAAGAA
UGAAGGAAUGCAAC-3'(서열번호 186)에서 선택된 서열일 수 있다.

[325]

[326] 엔지니어링 된 스캐폴드 영역 2 - 제2 영역 변형

[327] 제2 영역 변형 개관

[328] 본 명세서에서 제공하는 엔지니어링 된 가이드 RNA에 포함된 엔지니어링 된 스캐폴드 영역은 자연계에서 발견되는 스캐폴드 영역에서 제2 영역이 변형된 것일 수 있다.

[329] 일 구현예로, 상기 엔지니어링 된 스캐폴드 영역은 변형된 제2 영역을 포함할 수 있다. 이때, 상기 변형된 제2 영역은 자연계에서 발견되는 스캐폴드 영역의 제2 영역에서 하나 이상의 뉴클레오타이드가 제거된 것이다. 이때, 상기 제거된

뉴클레오타이드는 CRISPR/Cas12f1 복합체에서 Stem 구조를 형성하는 영역에서 선택된 뉴클레오타이드이다.

- [330] 일 구현예로, 상기 엔지니어링 된 Cas12f1 가이드 RNA에 포함된 엔지니어링 된 스캐폴드 영역은, 자연계에서 발견되는 제2 영역의 하나 이상의 뉴클레오타이드가 제거된 것일 수 있고, 선택적으로, 상기 제2 영역 외 다른 부분이 변형된 것을 추가로 포함할 수 있다. 일 구현예로, 상기 뉴클레오타이드의 제거는 상기 자연계에서 발견되는 제2 영역 중 Stem 구조를 형성하는 부분에서 일어난 것이고, 뉴클레오타이드가 상보적인 페어 단위로 제거된 것일 수 있다. 일 구현예로, 상기 제거된 뉴클레오타이드는 상기 자연계에서 발견되는 제2 영역 중 CRISPR/Cas12f1 복합체에서 Stem 구조를 형성하는 부분에 포함된 뉴클레오타이드일 수 있다. 일 구현예로, 상기 제거된 뉴클레오타이드는 상기 자연계에서 발견되는 제2 영역 중 Stem 2 (Takeda et al., Structure of the miniature type V-F CRISPR-Cas effector enzyme, Molecular Cell 81, 1-13 (2021))에 속하는 뉴클레오타이드일 수 있다. 일 구현예로, 상기 제거된 뉴클레오타이드는 상기 자연계에서 발견되는 제2 영역 중 CRISPR/Cas12f1 복합체에서 Cas12f1 단백질과 상호작용하지 않는 뉴클레오타이드일 수 있다.

- [331] 일 구현예로, 상기 변형된 제2 영역은 5'말단 방향에 5'-CCGCUUCAC-3'(서열번호 432) 서열을 가지는 것을 특징으로 한다. 일 구현예로, 상기 변형된 제2 영역은 3'말단 방향에 5'-UGAGUGAAGG-3'(서열번호 433) 서열을 가지는 것을 특징으로 한다.

- [332] 제2 영역 변형 내용 1 - 일부 뉴클레오타이드 제거

- [333] 상기 엔지니어링 된 스캐폴드 영역의 제2 영역은 자연계에서 발견되는 스캐폴드 영역의 제2 영역에서 하나 이상의 뉴클레오타이드가 제거된 것일 수 있다.

- [334] 일 구현예로, 상기 엔지니어링 된 스캐폴드 영역의 변형된 제2 영역은 자연계에서 발견되는 스캐폴드 영역의 제2 영역에서 연속 또는 비연속적으로 1개, 2개, 3개, 4개, 5개, 6개, 7개, 8개, 9개, 10개, 11개, 12개, 13개, 14개, 15개, 16개, 17개, 18개, 19개, 20개, 21개, 22개, 23개, 24개, 25개, 26개, 또는 27개의 뉴클레오타이드가 제거된 것일 수 있다. 일 구현예로, 상기 변형된 제2 영역은 상기 자연계에서 발견되는 스캐폴드 영역의 제2 영역에서, 서열번호 10 서열 기준으로, 5'말단으로부터 12번째 내지 24번째 뉴클레오타이드, 및/또는 27번째 내지 40번째 뉴클레오타이드 중 하나 이상의 뉴클레오타이드가 제거된 것일 수 있다. 일 구현예로, 상기 변형된 제2 영역은 상기 자연계에서 발견되는 스캐폴드 영역의 제2 영역에서, 서열번호 10 서열 기준으로, 5'말단으로부터 12번째 내지 24번째 뉴클레오타이드 중 1개, 2개, 3개, 4개, 5개, 6개, 7개, 8개, 9개, 10개, 11개, 12개, 또는 13개의 연속된 뉴클레오타이드가 제거된 것일 수 있다. 일 구현예로, 상기 변형된 제2 영역은 상기 자연계에서 발견되는 스캐폴드 영역의 제2 영역에서, 서열번호 10 서열

기준으로, 5'말단으로부터 27번째 내지 38번째 뉴클레오타이드 중 1개, 2개, 3개, 4개, 5개, 6개, 7개, 8개, 9개, 10개, 11개, 12개, 13개, 또는 14개의 연속된 뉴클레오타이드가 제거된 것일 수 있다.

- [335] 일 구현예로, 상기 변형된 제2 영역의 서열은 적어도 5'-CCGCUUCAC-3'(서열번호 432) 및 5'-UGAGUGAAGG-3'(서열번호 433)을 포함하는 것을 특징으로 한다. 이때, 상기 변형된 제2 영역의 서열은 5'말단에서 3'말단 방향으로 5'-CCGCUUCAC-3'(서열번호 432) 및 5'-UGAGUGAAGG-3'(서열번호 433)가 순서대로 연결되어 있을 수 있으며, 적절한 중간 서열을 통해 연결되어 있을 수 있다. 일 예로, 상기 중간 서열은 5'-UUAG-3', 5'-AUUAGU-3', 5'-AAUUAGCU-3', 5'-AAAUUAGACU-3'(서열번호 57), 5'-AAAGUUAGAACU-3'(서열번호 58), 5'-AAAGCUUAGGAACU-3'(서열번호 59), 5'-AAAGCUUUAGAGAACU-3'(서열번호 60), 5'-AAAGCUGUUAGUUAGAACU-3'(서열번호 61), 5'-AAAGCUGUUAGUAGAACU-3'(서열번호 62), 5'-AAAGCUGUUUAGAUAGAACU-3'(서열번호 63), 5'-AAAGCUGUCUUAGGAUUAGAACU-3'(서열번호 64), 5'-AAAGCUGUCCUUAGGGAUUAGAACU-3'(서열번호 65), 5'-AAAAGCUGUCCCUUAGGGGAUUAGAACUU-3'(서열번호 434), 및 5'-CAAAAGCUGUCCCUUAGGGGAUUAGAACUUG-3'(서열번호 435)로 이루어진 군에서 선택된 것일 수 있다.

[336] 제2 영역 변형 내용 2 - 상보적인 페어 단위 제거

- [337] 상기 제2 영역의 변형은 Stem 구조를 형성하는 부분에 포함된 서로 상보적인 결합을 하는 한 쌍 이상의 뉴클레오타이드가 제거된 것일 수 있다.
- [338] 일 구현예로, 상기 변형된 제2 영역은 상기 자연계에서 발견되는 스캐폴드 영역의 제2 영역에서, 서열번호 10 서열 기준으로, 5'말단으로부터 12번째 내지 24번째 뉴클레오타이드, 및 27번째 내지 40번째 뉴클레오타이드 중 CRISPR/Cas12f1 복합체에서 상보적인 페어를 이루는 1쌍 이상의 뉴클레오타이드가 제거된 것일 수 있다.
- [339] 일 구현예로, 상기 변형된 제2 영역은 상기 자연계에서 발견되는 스캐폴드 영역의 제2 영역에서, 서열번호 10 서열 기준으로, 5'말단으로부터 12번째 내지 24번째 뉴클레오타이드, 및 27번째 내지 40번째 뉴클레오타이드 중 CRISPR/Cas12f1 복합체에서 상보적인 페어를 이루는 1쌍 이상의 뉴클레오타이드 및/또는 상보적인 페어를 이루지 않는 1개 이상의 뉴클레오타이드가 제거된 것일 수 있다.
- [340] 일 구현예로, 상기 변형된 제2 영역은 상기 자연계에서 발견되는 스캐폴드 영역의 제2 영역에서, 서열번호 10 서열 기준으로, 5'말단으로부터 12번째 내지 24번째 뉴클레오타이드, 및 27번째 내지 40번째 뉴클레오타이드 중

CRISPR/Cas12f1 복합체에서 상보적인 페어를 이루는 1쌍 이상의 뉴클레오타이드 및/또는 미스매치인 1쌍 이상의 뉴클레오타이드가 제거된 것일 수 있다.

[341] 변형된 제2 영역 서열 예시

[342] 일 구현예로, 상기 변형된 제2 영역의 서열은

5'-CCGCUUCACUUAGAGUGAAGGUGG-3'(서열번호 430),

5'-CCGCUUCACCUUAGGAGUGAAGGUGG-3'(서열번호 431),

5'-CCGCUUCACCAUUAGUGAGUGAAGGUG-3'(서열번호 38),

5'-CCGCUUCACCAAUUAGUUGAGUGAAGGUG-3'(서열번호 39),

5'-CCGCUUCACCAAAUUAGCUUGAGUGAAGGUG-3'(서열번호 40),

5'-CCGCUUCACCAAAAUUAGACUUGAGUGAAGGUG-3'(서열번호 41),

5'-CCGCUUCACCAAAAAGUUAGAACUUGAGUGAAGGUG-3'(서열번호 42),

5'-CCGCUUCACCAAAAAGCUUAGGAACUUGAGUGAAGGUG-3'(서열번호 43),

5'-CCGCUUCACCAAAAAGCUUUAGAGAACUUGAGUGAAGGUG-3'(서열번호 44),

5'-CCGCUUCACCAAAAAGCUGUUAGUUAGAACUUGAGUGAAGGUG-3'(서열번호 45),

5'-CCGCUUCACCAAAAAGCUGUUAGUAGAACUUGAGUGAAGGUG-3'(서열번호 46),

5'-CCGCUUCACCAAAAAGCUGUUUAGAUUAGAACUUGAGUGAAGGUG-3'(서열번호 47),

5'-CCGCUUCACCAAAAAGCUGUCUUAGGAUUAGAACUUGAGUGAAGGUG-3'(서열번호 48), 및

5'-CCGCUUCACCAAAAAGCUGUCCUUAGGGAUUAGAACUUGAGUGAAGGUG-3'(서열번호 49)로 이루어진 군에서 선택된 서열일 수 있다.

[343] 일 구현예로, 제2 영역이 변형된 엔지니어링 된 스캐폴드 영역의 서열은 다음을 포함할 수 있다:

[344] 5'말단에서 3'말단 방향으로,

[345] 서열번호 9,

[346] 서열번호 38 내지 서열번호 49, 및 서열번호 430 내지 서열번호 431로 이루어진 군에서 선택된 서열,

[347] 서열번호 11, 및

[348] 서열번호 12이 연결된 서열; 및

[349] 5'말단에서 3'말단 방향으로, 서열번호 14 및 5'-AUGCAAC-3'가 연결된 서열.

[350] 일 구현예로, 제2 영역이 변형된 엔지니어링 된 스캐폴드 영역의 서열은 다음을 포함할 수 있다:

[351] 5'-CUUCACUGAUAAAGUGGAGAACCGCUUCACCAUUAGUGAGUGAAGGUGGGCUGCUUGCAUCAGCCUAAUGUCGAGAAGUGCUUUCUUCGGAAAGU

AACCCUCGAAACAAAUUCAUUU-3'(서열번호 138),
 5'-CUUCACUGAUAAAGUGGAGAACCGCUUCACCAAUAGUUGAGUGAAG
 GUGGGCUGCUUGCAUCAGCCUAAUGUCGAGAAGUGCUUUCUUCGGAAAG
 UAACCCUCGAAACAAAUUCAUUU-3'(서열번호 139),
 5'-CUUCACUGAUAAAGUGGAGAACCGCUUCACCAAUAGACUUGAGUG
 AAGGUGGGCUGCUUGCAUCAGCCUAAUGUCGAGAAGUGCUUUCUUCGGA
 AAGUAACCCUCGAAACAAAUUCAUUU-3'(서열번호 140),
 5'-CUUCACUGAUAAAGUGGAGAACCGCUUCACCAAAGUUAGAACUUGA
 GUGAAGGUGGGCUGCUUGCAUCAGCCUAAUGUCGAGAAGUGCUUUCUUC
 GGAAAGUAACCCUCGAAACAAAUUCAUUU-3'(서열번호 141),
 5'-CUUCACUGAUAAAGUGGAGAACCGCUUCACCAAAGCUUAGGAACUU
 GAGUGAAGGUGGGCUGCUUGCAUCAGCCUAAUGUCGAGAAGUGCUUUCU
 UCGGAAAGUAACCCUCGAAACAAAUUCAUUU-3'(서열번호 142),
 5'-CUUCACUGAUAAAGUGGAGAACCGCUUCACCAAAGCUUAGAGAAC
 UUGAGUGAAGGUGGGCUGCUUGCAUCAGCCUAAUGUCGAGAAGUGCUUU
 CUUCGGAAAGUAACCCUCGAAACAAAUUCAUUU-3'(서열번호 143),
 5'-CUUCACUGAUAAAGUGGAGAACCGCUUCACCAAAGCUGUUAGUUAG
 AACUUGAGUGAAGGUGGGCUGCUUGCAUCAGCCUAAUGUCGAGAAGUGC
 UUUCUUCGGAAAGUAACCCUCGAAACAAAUUCAUUU-3'(서열번호 144),
 5'-CUUCACUGAUAAAGUGGAGAACCGCUUCACCAAAGCUGUUAGUAGA
 ACUUGAGUGAAGGUGGGCUGCUUGCAUCAGCCUAAUGUCGAGAAGUGCU
 UUCUUCGGAAAGUAACCCUCGAAACAAAUUCAUUU-3'(서열번호 145),
 5'-CUUCACUGAUAAAGUGGAGAACCGCUUCACCAAAGCUGUUAGAUU
 AGAACUUGAGUGAAGGUGGGCUGCUUGCAUCAGCCUAAUGUCGAGAAGU
 GCUUUCUUCGGAAAGUAACCCUCGAAACAAAUUCAUUU-3'(서열번호 146),
 5'-CUUCACUGAUAAAGUGGAGAACCGCUUCACCAAAGCUGUCUUAGGA
 UUAGAACUUGAGUGAAGGUGGGCUGCUUGCAUCAGCCUAAUGUCGAGAA
 GUGCUUUCUUCGGAAAGUAACCCUCGAAACAAAUUCAUUU-3'(서열번호
 147), 및
 5'-CUUCACUGAUAAAGUGGAGAACCGCUUCACCAAAGCUGUCCUUAGGG
 AUUAGAACUUGAGUGAAGGUGGGCUGCUUGCAUCAGCCUAAUGUCGAGA
 AGUGCUUUCUUCGGAAAGUAACCCUCGAAACAAAUUCAUUU-3'(서열번호
 148)로 이루어진 군에서 선택된 서열; 및

[352] 서열번호 3.

[353] 일 구현예로, 제2 영역이 변형된 엔지니어링 된 스캐폴드 영역의 서열은 다음을 포함할 수 있다:

[354] 5'말단에서 3'말단 방향으로,

[355] 서열번호 9,

- [356] 서열번호 38 내지 서열번호 49, 및 서열번호 430 내지 서열번호 431에서 선택된 서열,
- [357] 서열번호 11,
- [358] 서열번호 13이 연결된 서열; 및
- [359] 5'말단에서 3'말단 방향으로, 서열번호 15 및 5'-AUGCAAC-3'가 연결된 서열.
- [360] 일 구현예로, 제2 영역이 변형된 엔지니어링 된 스캐폴드 영역의 서열은 5'말단에서 3'말단 방향으로, 서열번호 9, 서열번호 38 내지 서열번호 49, 및 서열번호 430 내지 서열번호 431에서 선택된 서열, 서열번호 11, 서열번호 12, 링커, 서열번호 14, 및 5'-AUGCAAC-3'가 연결된 것일 수 있다.
- [361] 이때, 상기 링커는 5'-GAAA-3'일 수 있다.
- [362] 일 구현예로, 제2 영역이 변형된 엔지니어링 된 스캐폴드 영역의 서열은 5'-CUUCACUGAUAAAGUGGAGAACCGCUUCACCAUAGUGAGUGAAGGU GGGCUGCUUGCAUCAGCCUAAUGUCGAGAAGUGCUUUCUUCGGAAAGUA ACCCUCGAAACAAAUUCAUUUGAAAGAAUGAAGGAAUGCAAC-3'(서열번호 187), 5'-CUUCACUGAUAAAGUGGAGAACCGCUUCACCAAUAGUUGAGUGAAG GUGGGCUGCUUGCAUCAGCCUAAUGUCGAGAAGUGCUUUCUUCGGAAAG UAACCCUCGAAACAAAUUCAUUUGAAAGAAUGAAGGAAUGCAAC-3'(서열번호 188), 5'-CUUCACUGAUAAAGUGGAGAACCGCUUCACCAAAUAGCUUGAGUGA AGGUGGGCUGCUUGCAUCAGCCUAAUGUCGAGAAGUGCUUUCUUCGGAA AGUAACCCUCGAAACAAAUUCAUUUGAAAGAAUGAAGGAAUGCAAC-3'(서열번호 189), 5'-CUUCACUGAUAAAGUGGAGAACCGCUUCACCAAAAUAGACUUGAGU GAAGGUGGGCUGCUUGCAUCAGCCUAAUGUCGAGAAGUGCUUUCUUCGG AAAGUAACCCUCGAAACAAAUUCAUUUGAAAGAAUGAAGGAAUGCAAC-3'(서열번호 190), 5'-CUUCACUGAUAAAGUGGAGAACCGCUUCACCAAAAAGUUAGAACUUGA GUGAAGGUGGGCUGCUUGCAUCAGCCUAAUGUCGAGAAGUGCUUUCUUC GGAAAGUAACCCUCGAAACAAAUUCAUUUGAAAGAAUGAAGGAAUGCAA C-3'(서열번호 191), 5'-CUUCACUGAUAAAGUGGAGAACCGCUUCACCAAAAAGCUUAGGAACUU GAGUGAAGGUGGGCUGCUUGCAUCAGCCUAAUGUCGAGAAGUGCUUUCU UCGGAAAGUAACCCUCGAAACAAAUUCAUUUGAAAGAAUGAAGGAAUGC AAC-3'(서열번호 192), 5'-CUUCACUGAUAAAGUGGAGAACCGCUUCACCAAAAAGCUUUAGAGAAC UUGAGUGAAGGUGGGCUGCUUGCAUCAGCCUAAUGUCGAGAAGUGCUUU CUUCGGAAAGUAACCCUCGAAACAAAUUCAUUUGAAAGAAUGAAGGAAU

GCAAC-3'(서열번호 193),

5'-CUUCACUGAUAAAGUGGAGAACCGCUUCACCAAAAGCUGUUAGUAGA
ACUUGAGUGAAGGUGGGCUGCUUGCAUCAGCCUAAUGUCGAGAAGUGCU
UUCUUCGGAAAGUAACCCUCGAAACAAAUUCAUUUGAAAGAAUGAAGGA
AUGCAAC-3'(서열번호 194),

5'-CUUCACUGAUAAAGUGGAGAACCGCUUCACCAAAAGCUGUUAGUUAG
AACUUGAGUGAAGGUGGGCUGCUUGCAUCAGCCUAAUGUCGAGAAGUGC
UUUCUUCGGAAAGUAACCCUCGAAACAAAUUCAUUUGAAAGAAUGAAGG
AAUGCAAC-3'(서열번호 195),

5'-CUUCACUGAUAAAGUGGAGAACCGCUUCACCAAAAGCUGUUUAGAUU
AGAACUUGAGUGAAGGUGGGCUGCUUGCAUCAGCCUAAUGUCGAGAAGU
GCUUUCUUCGGAAAGUAACCCUCGAAACAAAUUCAUUUGAAAGAAUGAA
GGAAUGCAAC-3'(서열번호 196),

5'-CUUCACUGAUAAAGUGGAGAACCGCUUCACCAAAAGCUGUCUUAGGA
UUAGAACUUGAGUGAAGGUGGGCUGCUUGCAUCAGCCUAAUGUCGAGAA
GUGCUUUCUUCGGAAAGUAACCCUCGAAACAAAUUCAUUUGAAAGAAUG
AAGGAAUGCAAC-3'(서열번호 197), 및

5'-CUUCACUGAUAAAGUGGAGAACCGCUUCACCAAAAGCUGUCCUUAGGG
AUUAGAACUUGAGUGAAGGUGGGCUGCUUGCAUCAGCCUAAUGUCGAGA
AGUGCUUUCUUCGGAAAGUAACCCUCGAAACAAAUUCAUUUGAAAGAAU
GAAGGAAUGCAAC-3'(서열번호 198)로 이루어진 군에서 선택된 것일 수 있다.

[363]

[364] 엔지니어링 된 스캐폴드 영역 3 - 제3 영역 변형

[365] 본 명세서에서 제공하는 엔지니어링 된 스캐폴드에서 제3 영역은 DNA 절단
활성에 핵심적인 영향을 미치는 Stem 4 부분을 포함하는 영역이다. 따라서, 상기
엔지니어링 된 스캐폴드의 제3 영역은 자연계에서 발견되는 스캐폴드의 제3
영역과 동일하거나, 상기 제3 영역의 기능이 손상되지 않는 한도 내에서 변형된
것일 수 있다.

[366]

[367] 엔지니어링 된 스캐폴드 영역 4 - 제4 영역 및 제5 영역 변형

[368] 제4 영역 및 제5 영역 변형 개관

[369] 본 명세서에서 제공하는 엔지니어링 된 스캐폴드 영역은 자연계에서 발견되는
스캐폴드 영역에서 제4 영역 및 제5 영역이 변형된 것일 수 있다. 상기 제4 영역
및 제5 영역은 CRISPR/Cas12f1 복합체 내에서 서로 혼성화되어 Stem을 구성하는
부분을 포함하므로, 해당 부분이 같이 변형되어 엔지니어링 된 스캐폴드 영역을
구성할 수 있다.

[370] 일 구현예로, 상기 엔지니어링 된 스캐폴드 영역은 변형된 제4 영역 및/또는
변형된 제5 영역을 포함할 수 있다.

- [371] 변형된 제4 영역은 자연계에서 발견되는 스캐폴드의 제4 영역에서 하나 이상의 뉴클레오타이드가 제거된 것을 특징으로 한다. 변형된 제5 영역은 자연계에서 발견되는 스캐폴드의 제5 영역에서 하나 이상의 뉴클레오타이드가 제거된 것을 특징으로 한다.
- [372] 일 구현예로, 상기 엔지니어링 된 Cas12f1 가이드 RNA에 포함된 엔지니어링 된 스캐폴드 영역은, 자연계에서 발견되는 스캐폴드 영역 중 제4 영역 및/또는 제5 영역의 하나 이상의 뉴클레오타이드가 제거된 것일 수 있다.
- [373] 일 구현예로, 상기 변형된 제4 영역은 5'말단 방향에 5'-AACAAA-3' 서열을 가지는 것을 특징으로 한다. 일 구현예로, 상기 변형된 제5 영역은 3'말단 방향에 5'-GGA-3' 서열을 가지는 것을 특징으로 한다.
- [374] 제4 영역 및 제5 영역 변형 내용 1 - 일부 뉴클레오타이드 제거
- [375] 상기 엔지니어링 된 스캐폴드 영역의 제4 영역은 자연계에서 발견되는 스캐폴드 영역 중 제4 영역에서 하나 이상의 뉴클레오타이드가 제거된 것일 수 있다. 상기 엔지니어링 된 스캐폴드 영역의 제5 영역은 자연계에서 발견되는 스캐폴드 영역 중 제5 영역에서 하나 이상의 뉴클레오타이드가 제거된 것일 수 있다.
- [376] 일 구현예로, 상기 엔지니어링 된 스캐폴드 영역의 변형된 제4 영역은 자연계에서 발견되는 스캐폴드 영역의 제4 영역에서 연속 또는 비연속적으로 1개, 2개, 3개, 4개, 5개, 6개, 또는 7개의 뉴클레오타이드가 제거된 것일 수 있다.
- [377] 일 구현예로, 상기 엔지니어링 된 스캐폴드 영역의 변형된 제4 영역은 자연계에서 발견되는 스캐폴드 영역의 제4 영역에서 연속적으로 또는 비연속적으로 1개, 2개, 3개, 4개, 5개, 6개, 7개, 8개, 9개, 10개, 11개, 12개, 13개, 14개, 15개, 16개, 17개, 18개, 19개, 20개, 21개, 22개, 23개, 24개, 25개, 26개, 27개 또는 28개의 뉴클레오타이드가 제거된 것일 수 있다.
- [378] 일 구현예로, 상기 변형된 제4 영역은 상기 자연계에서 발견되는 스캐폴드 영역의 제4 영역에서, 서열번호 12 서열 기준으로, 5'말단으로부터 7번째 내지 13번째 뉴클레오타이드 중 하나 이상의 뉴클레오타이드가 제거된 것일 수 있다. 일 구현예로, 상기 변형된 제4 영역은 상기 자연계에서 발견되는 스캐폴드 영역의 제4 영역에서, 서열번호 13 서열 기준으로, 5'말단으로부터 7번째 내지 34번째 뉴클레오타이드 중 하나 이상의 뉴클레오타이드가 제거된 것일 수 있다.
- [379] 일 구현예로, 상기 변형된 제4 영역의 서열은 적어도 5'-AACAAA-3'을 포함하는 것을 특징으로 한다.
- [380] 일 구현예로, 상기 엔지니어링 된 스캐폴드 영역의 변형된 제5 영역은 자연계에서 발견되는 스캐폴드 영역의 제5 영역에서 연속 또는 비연속적으로 1개, 2개, 3개, 4개, 5개, 6개, 또는 7개의 뉴클레오타이드가 제거된 것일 수 있다.
- [381] 일 구현예로, 상기 엔지니어링 된 스캐폴드 영역의 변형된 제5 영역은

자연계에서 발견되는 스캐폴드 영역의 제5 영역에서 연속 또는 비연속적으로 1개, 2개, 3개, 4개, 5개, 6개, 7개, 8개, 9개, 10개, 11개, 12개, 13개, 14개, 15개, 16개, 17개, 18개, 19개, 20개, 21개, 22개, 23개, 24개, 25개, 26개, 또는 27개의 뉴클레오타이드가 제거된 것일 수 있다.

- [382] 일 구현예로, 상기 변형된 제5 영역은 상기 자연계에서 발견되는 스캐폴드 영역의 제5 영역에서, 서열번호 14 서열 기준으로, 5'말단으로부터 1번째 내지 7번째 뉴클레오타이드 중 하나 이상의 뉴클레오타이드가 제거된 것일 수 있다. 일 구현예로, 상기 변형된 제5 영역은 상기 자연계에서 발견되는 스캐폴드 영역의 제5 영역에서, 서열번호 15 서열 기준으로, 5'말단으로부터 1번째 내지 27번째 뉴클레오타이드 중 하나 이상의 뉴클레오타이드가 제거된 것일 수 있다.
- [383] 일 구현예로, 상기 변형된 제5 영역의 서열은 적어도 5'-GGA-3'을 포함하는 것을 특징으로 한다.

[384] 제4 영역 및 제5 영역 변형 내용 3 - 상보적인 페어 단위 제거

- [385] 상기 제4 영역 및 제5 영역은 CRISPR/Cas12 복합체 내에서 서로 상보적으로 결합하여 Stem을 이루는 것으로 알려져 있다. 전술한 제4 영역 및 제5 영역의 변형은 이러한 Stem을 구성하는 하나 이상의 뉴클레오타이드를 대상으로 하므로, 상기 제4 영역 및 제5 영역의 변형은 Stem을 구성하는 뉴클레오타이드들을 상보적인 페어 단위로 제거하는 것일 수 있다.
- [386] 일 구현예로, 상기 변형된 제4 영역 및 제5 영역은 상기 자연계에서 발견되는 스캐폴드 영역의 제4 영역 및 제5 영역에서, 서열번호 12 서열 기준으로 7번째 내지 13번째 뉴클레오타이드, 및 서열번호 14 서열 기준으로 1번째 내지 7번째 뉴클레오타이드 중 CRISPR/Cas12f1 복합체에서 상보적인 페어를 이루는 1쌍 이상의 뉴클레오타이드가 제거된 것일 수 있다.
- [387] 일 구현예로, 상기 변형된 제4 영역 및 제5 영역은 상기 자연계에서 발견되는 스캐폴드 영역의 제4 영역 및 제5 영역에서, 서열번호 12 서열 기준으로 7번째 내지 13번째 뉴클레오타이드 및, 서열번호 14 서열 기준으로 1번째 내지 7번째 뉴클레오타이드 중 CRISPR/Cas12f1 복합체에서 상보적인 페어를 이루는 1쌍 이상의 뉴클레오타이드 및/또는 상보적인 페어를 이루지 않는 1개 이상의 뉴클레오타이드가 제거된 것일 수 있다.
- [388] 일 구현예로, 상기 변형된 제4 영역 및 제5 영역은 상기 자연계에서 발견되는 스캐폴드 영역의 제4 영역 및 제5 영역에서, 서열번호 12 서열 기준으로 7번째 내지 13번째 뉴클레오타이드 및, 서열번호 14 서열 기준으로 1번째 내지 7번째 뉴클레오타이드 중 CRISPR/Cas12f1 복합체에서 상보적인 페어를 이루는 1쌍 이상의 뉴클레오타이드 및/또는 미스매치인 1쌍 이상의 뉴클레오타이드가 제거된 것일 수 있다.
- [389] 일 구현예로, 상기 변형된 제4 영역 및 제5 영역은 상기 자연계에서 발견되는 스캐폴드 영역의 제4 영역 및 제5 영역에서, 서열번호 13 서열 기준으로 7번째 내지 34번째 뉴클레오타이드 및, 서열번호 15 서열 기준으로 1번째 내지 27번째

뉴클레오타이드 중 CRISPR/Cas12f1 복합체에서 상보적인 페어를 이루는 1쌍 이상의 뉴클레오타이드가 제거된 것일 수 있다.

[390] 일 구현예로, 상기 변형된 제4 영역 및 제5 영역은 상기 자연계에서 발견되는 스캐폴드 영역의 제4 영역 및 제5 영역에서, 서열번호 13 서열 기준으로 7번째 내지 34번째 뉴클레오타이드 및, 서열번호 15 서열 기준으로 1번째 내지 27번째 뉴클레오타이드 중 CRISPR/Cas12f1 복합체에서 상보적인 페어를 이루는 1쌍 이상의 뉴클레오타이드 및/또는 상보적인 페어를 이루지 않는 1개 이상의 뉴클레오타이드가 제거된 것일 수 있다.

[391] 일 구현예로, 상기 변형된 제4 영역 및 제5 영역은 상기 자연계에서 발견되는 스캐폴드 영역의 제4 영역 및 제5 영역에서, 서열번호 13 서열 기준으로 7번째 내지 34번째 뉴클레오타이드 및, 서열번호 15 서열 기준으로 1번째 내지 27번째 뉴클레오타이드 중 CRISPR/Cas12f1 복합체에서 상보적인 페어를 이루는 1쌍 이상의 뉴클레오타이드 및/또는 미스매치인 1쌍 이상의 뉴클레오타이드가 제거된 것일 수 있다.

[392] 변형된 제4 영역 및 제5 영역 서열 예시

[393] 일 구현예로, 상기 변형된 제4 영역의 서열은 5'-AACAAA-3', 5'-AACAAAU-3', 5'-AACAAAUU-3', 5'-AACAAAUUC-3', 5'-AACAAAUUCA-3'(서열번호 66), 5'-AACAAAUUCAU-3'(서열번호 67), 및 5'-AACAAAUUCAUU-3'(서열번호 68)로 이루어진 군에서 선택된 것일 수 있다.

[394] 일 구현예로, 상기 변형된 제4 영역의 서열은 5'-AACAAA-3', 5'-AACAAAU-3', 5'-AACAAAUU-3', 5'-AACAAAUUC-3', 5'-AACAAAUUCA-3'(서열번호 66), 5'-AACAAAUUCAU-3'(서열번호 67), 5'-AACAAAUUCAUU-3'(서열번호 68), 5'-AACAAAUUCAUUU-3'(서열번호 69), 5'-AACAAAUUCAUUUU-3'(서열번호 70), 5'-AACAAAUUCAUUUUU-3'(서열번호 71), 5'-AACAAAUUCAUUUUUC-3'(서열번호 72), 5'-AACAAAUUCAUUUUUCC-3'(서열번호 73), 5'-AACAAAUUCAUUUUUCCU-3'(서열번호 74), 5'-AACAAAUUCAUUUUUCCUC-3'(서열번호 75), 5'-AACAAAUUCAUUUUUCCUCU-3'(서열번호 76), 5'-AACAAAUUCAUUUUUCCUCUC-3'(서열번호 77), 5'-AACAAAUUCAUUUUUCCUCUCC-3'(서열번호 78), 5'-AACAAAUUCAUUUUUCCUCUCCA-3'(서열번호 79), 5'-AACAAAUUCAUUUUUCCUCUCCAA-3'(서열번호 80), 5'-AACAAAUUCAUUUUUCCUCUCCAAU-3'(서열번호 81), 5'-AACAAAUUCAUUUUUCCUCUCCAAUU-3'(서열번호 82), 5'-AACAAAUUCAUUUUUCCUCUCCAAUUC-3'(서열번호 83), 5'-AACAAAUUCAUUUUUCCUCUCCAAUUCU-3'(서열번호 84), 5'-AACAAAUUCAUUUUUCCUCUCCAAUUCUG-3'(서열번호 85),

5'-AACAAAUUCAUUUUUCCUCUCCAAUUCUGC-3'(서열번호 86),
 5'-AACAAAUUCAUUUUUCCUCUCCAAUUCUGCA-3'(서열번호 87),
 5'-AAACAAAUUCAUUUUUCCUCUCCAAUUCUGCAC-3'(서열번호 88), 및
 5'-AACAAAUUCAUUUUUCCUCUCCAAUUCUGCACA-3'(서열번호 89)로
 이루어진 군에서 선택된 것일 수 있다.

[395] 일 구현예로, 상기 변형된 제5 영역의 서열은 5'-GGA-3', 5'-AGGA-3',
 5'-AAGGA-3', 5'-GAAGGA-3', 5'-UGAAGGA-3', 5'-AUGAAGGA-3', 및
 5'-AAUGAAGGA-3'에서 선택된 것일 수 있다.

[396] 일 구현예로, 상기 변형된 제5 영역의 서열은 5'-GGA-3', 5'-AGGA-3',
 5'-AAGGA-3', 5'-GAAGGA-3', 5'-UGAAGGA-3', 5'-AUGAAGGA-3',
 5'-AAUGAAGGA-3', 5'-GAAUGAAGGA-3'(서열번호 90),
 5'-CGAAUGAAGGA-3'(서열번호 91), 5'-ACGAAUGAAGGA-3'(서열번호 92),
 5'-GACGAAUGAAGGA-3'(서열번호 93), 5'-AGACGAAUGAAGGA-3'(서열번호
 94), 5'-UAGACGAAUGAAGGA-3'(서열번호 95),
 5'-AUAGACGAAUGAAGGA-3'(서열번호 96),
 5'-AAUAGACGAAUGAAGGA-3'(서열번호 97),
 5'-GAAUAGACGAAUGAAGGA-3'(서열번호 98),
 5'-CGAAUAGACGAAUGAAGGA-3'(서열번호 99),
 5'-CCGAAUAGACGAAUGAAGGA-3'(서열번호 100),
 5'-CCCGAAUAGACGAAUGAAGGA-3'(서열번호 101),
 5'-ACCCGAAUAGACGAAUGAAGGA-3'(서열번호 102),
 5'-AACCCGAAUAGACGAAUGAAGGA-3'(서열번호 103),
 5'-GAACCCGAAUAGACGAAUGAAGGA-3'(서열번호 104),
 5'-AGAACCCGAAUAGACGAAUGAAGGA-3'(서열번호 105),
 5'-CAGAACCCGAAUAGACGAAUGAAGGA-3'(서열번호 106),
 5'-GCAGAACCCGAAUAGACGAAUGAAGGA-3'(서열번호 107),
 5'-UGCAGAACCCGAAUAGACGAAUGAAGGA-3'(서열번호 108), 및
 5'-UUGCAGAACCCGAAUAGACGAAUGAAGGA-3'(서열번호 109)로 이루어진
 군에서 선택된 것일 수 있다.

[397] 일 구현예로, 제4 영역 및 제5 영역이 변형된 엔지니어링 된 스캐폴드 영역의
 서열은 다음을 포함할 수 있다:

[398] 5'말단에서 3'말단 방향으로,

[399] 서열번호 9,

[400] 서열번호 10,

[401] 서열번호 11, 및

[402] 5'-AACAAA-3', 5'-AACAAAU-3', 5'-AACAAAUU-3',

5'-AACAAAUUC-3', 서열번호 66 내지 68로 이루어진 군에서 선택된 서열이
 연결된 서열; 및

- [403] 5'말단에서 3'말단 방향으로,
- [404] 5'-GGA-3', 5'-AGGA-3', 5'-AAGGA-3', 5'-GAAGGA-3', 5'-UGAAGGA-3',
5'-AUGAAGGA-3', 및 5'-AAUGAAGGA-3'로 이루어진 군에서 선택된 서열, 및
- [405] 5'-AUGCAAC-3'가 연결된 서열.
- [406] 일 구현예로, 제4 영역 및 제5 영역이 변형된 엔지니어링 된 스캐폴드 영역의
서열은 다음을 포함할 수 있다:
- [407] 5'-CUUCACUGAUAAAGUGGAGAACCGCUUCACCAAAAGCUGUCCCUUAG
GGGAUUAGAACUUGAGUGAAGGUGGGCUGCUUGCAUCAGCCUAAUGUCG
AGAAGUGCUUUCUUCGGAAAGUAACCCUCGAAACAAA-3'(서열번호 149),
5'-CUUCACUGAUAAAGUGGAGAACCGCUUCACCAAAAGCUGUCCCUUAGG
GGAUUAGAACUUGAGUGAAGGUGGGCUGCUUGCAUCAGCCUAAUGUCGA
GAAGUGCUUUCUUCGGAAAGUAACCCUCGAAACAAAU-3'(서열번호 150),
5'-CUUCACUGAUAAAGUGGAGAACCGCUUCACCAAAAGCUGUCCCUUAGG
GGAUUAGAACUUGAGUGAAGGUGGGCUGCUUGCAUCAGCCUAAUGUCGA
GAAGUGCUUUCUUCGGAAAGUAACCCUCGAAACAAAUU-3'(서열번호 151),
5'-CUUCACUGAUAAAGUGGAGAACCGCUUCACCAAAAGCUGUCCCUUAGG
GGAUUAGAACUUGAGUGAAGGUGGGCUGCUUGCAUCAGCCUAAUGUCGA
GAAGUGCUUUCUUCGGAAAGUAACCCUCGAAACAAAUUC-3'(서열번호
152),
5'-CUUCACUGAUAAAGUGGAGAACCGCUUCACCAAAAGCUGUCCCUUAGG
GGAUUAGAACUUGAGUGAAGGUGGGCUGCUUGCAUCAGCCUAAUGUCGA
GAAGUGCUUUCUUCGGAAAGUAACCCUCGAAACAAAUUCA-3'(서열번호
153),
5'-CUUCACUGAUAAAGUGGAGAACCGCUUCACCAAAAGCUGUCCCUUAGG
GGAUUAGAACUUGAGUGAAGGUGGGCUGCUUGCAUCAGCCUAAUGUCGA
GAAGUGCUUUCUUCGGAAAGUAACCCUCGAAACAAAUUCAU-3'(서열번호
154), 및
5'-CUUCACUGAUAAAGUGGAGAACCGCUUCACCAAAAGCUGUCCCUUAGG
GGAUUAGAACUUGAGUGAAGGUGGGCUGCUUGCAUCAGCCUAAUGUCGA
GAAGUGCUUUCUUCGGAAAGUAACCCUCGAAACAAAUUCAUU-3'(서열번
호 155)로 이루어진 군에서 선택된 서열; 및
- [408] 5'-GGAAUGCAAC-3', 5'-AGGAAUGCAAC-3', 5'-AAGGAAUGCAAC-3',
5'-GAAGGAAUGCAAC-3', 5'-UGAAGGAAUGCAAC-3',
5'-AUGAAGGAAUGCAAC-3', 및 5'-AAUGAAGGAAUGCAAC-3'로 이루어진
군에서 선택된 서열.
- [409] 일 구현예로, 제4 영역 및 제5 영역이 변형된 엔지니어링 된 스캐폴드 영역의
서열은 다음을 포함할 수 있다:
- [410] 5'말단에서 3'말단 방향으로,

- [411] 서열번호 9,
 [412] 서열번호 10,
 [413] 서열번호 11, 및
 [414] 5'-AACAAA-3', 5'-AACAAAU-3', 5'-AACAAAUU-3', 5'-AACAAAUUC-3',
 서열번호 66 내지 89로 이루어진 군에서 선택된 서열이 연결된 서열; 및
 [415] 5'말단에서 3'말단 방향으로,
 [416] 5'-GGA-3', 5'-AGGA-3', 5'-AAGGA-3', 5'-GAAGGA-3', 5'-UGAAGGA-3',
 5'-AUGAAGGA-3', 5'-AAUGAAGGA-3', 서열번호 90 내지 109로 이루어진
 군에서 선택된 서열, 및
 [417] 5'-AUGCAAC-3'가 연결된 서열.
 [418] 일 구현예로, 제4 영역 및 제5 영역이 변형된 엔지니어링 된 스캐폴드 영역의
 서열은 5'말단에서 3'말단 방향으로,
 [419] 서열번호 9,
 [420] 서열번호 10,
 [421] 서열번호 11, 및
 [422] 5'-AACAAAGAAAGGA-3'(서열번호 110),
 5'-AACAAAUGAAAAGGA-3'(서열번호 111),
 5'-AACAAAUUGAAAAAGGA-3'(서열번호 112),
 5'-AACAAAUUCGAAAGAAGGA-3'(서열번호 113),
 5'-AACAAAUUCAGAAAUUGAAGGA-3'(서열번호 114),
 5'-AACAAAUUCAUGAAAAUGAAGGA-3'(서열번호 115), 및
 5'-AACAAAUUCAUUGAAAAAUGAAGGA-3'(서열번호 116)에서 선택된 서열,
 및
 [423] 5'-AUGCAAC-3'가 연결된 것일 수 있다.
 [424] 일 구현예로, 제4 영역 및 제5 영역이 변형된 엔지니어링 된 스캐폴드 영역의
 서열은
 5'-CUUCACUGAUAAAGUGGAGAACCGCUUCACCAAAGCUGUCCCUUAGG
 GGAUUAGAACUUGAGUGAAGGUGGGCUGCUUGCAUCAGCCUAAUGUCGA
 GAAGUGCUUUCUUCGGAAAGUAACCCUCGAAACAAAGAAAGGAAUGCAA
 C-3'(서열번호 199),
 5'-CUUCACUGAUAAAGUGGAGAACCGCUUCACCAAAGCUGUCCCUUAGG
 GGAUUAGAACUUGAGUGAAGGUGGGCUGCUUGCAUCAGCCUAAUGUCGA
 GAAGUGCUUUCUUCGGAAAGUAACCCUCGAAACAAUUGAAAAAGGAAUGC
 AAC-3'(서열번호 200),
 5'-CUUCACUGAUAAAGUGGAGAACCGCUUCACCAAAGCUGUCCCUUAGG
 GGAUUAGAACUUGAGUGAAGGUGGGCUGCUUGCAUCAGCCUAAUGUCGA
 GAAGUGCUUUCUUCGGAAAGUAACCCUCGAAACAAUUGAAAAAGGAAU
 GCAAC-3'(서열번호 201),

5'-CUUCACUGAUAAAAGUGGAGAACCGCUUCACCAAAAAGCUGUCCCUUAGG
GGAUUAGAACUUGAGUGAAGGUGGGCUGCUUGCAUCAGCCUAAUGUCGA
GAAGUGCUUUCUUCGGAAAGUAACCCUCGAAACAAAUUCGAAAGAAGGA
AUGCAAC-3'(서열번호 202),

5'-CUUCACUGAUAAAAGUGGAGAACCGCUUCACCAAAAAGCUGUCCCUUAGG
GGAUUAGAACUUGAGUGAAGGUGGGCUGCUUGCAUCAGCCUAAUGUCGA
GAAGUGCUUUCUUCGGAAAGUAACCCUCGAAACAAAUUCAGAAAUGAAG
GAAUGCAAC-3'(서열번호 203),

5'-CUUCACUGAUAAAAGUGGAGAACCGCUUCACCAAAAAGCUGUCCCUUAGG
GGAUUAGAACUUGAGUGAAGGUGGGCUGCUUGCAUCAGCCUAAUGUCGA
GAAGUGCUUUCUUCGGAAAGUAACCCUCGAAACAAAUUCAUGAAAAUGA
AGGAAUGCAAC-3'(서열번호 204), 및

5'-CUUCACUGAUAAAAGUGGAGAACCGCUUCACCAAAAAGCUGUCCCUUAGG
GGAUUAGAACUUGAGUGAAGGUGGGCUGCUUGCAUCAGCCUAAUGUCGA
GAAGUGCUUUCUUCGGAAAGUAACCCUCGAAACAAAUUCAUUGAAAAAU
GAAGGAAUGCAAC-3'(서열번호 205)로 이루어진 군에서 선택된 것일 수 있다.

[425]

[426] 엔지니어링 된 스캐폴드 영역 5 - 제6 영역 변형

[427] 본 명세서에서 제공하는 엔지니어링 된 스캐폴드에서 제6 영역은 PK (R:AR-1) 부분 중 crRNA에 속한 뉴클레오타이드를 포함하는 영역이다. 전술한 바, 상기 제6 영역은 CRISPR/Cas12f1 복합체에서, 이량체를 이루는 하나의 Cas12f1 단백질의 WED 도메인, ZF 도메인 및/또는 RuvC 도메인과 상호작용하는 하나 이상의 뉴클레오타이드를 포함한다. 상기 엔지니어링 된 스캐폴드의 제6 영역은 자연계에서 발견되는 스캐폴드의 제6 영역과 동일하거나, 상기 제6 영역의 기능이 손상되지 않는 한도 내에서 변형된 것일 수 있다.

[428]

[429] 엔지니어링 된 스캐폴드 영역 6 - 각 변형의 조합

[430] 각 변형의 조합 개관

[431] 본 명세서에서 제공하는 엔지니어링 된 Cas12f1 가이드 RNA에 포함된 엔지니어링 된 스캐폴드 영역은, 자연계에서 발견되는 스캐폴드 영역에 전술한 각 영역 별 변형이 하나 이상 조합된 것일 수 있다.

[432] 일 구현예로, 상기 엔지니어링 된 스캐폴드 영역은 변형된 제1 영역, 및 변형된 제2 영역을 포함할 수 있다.

[433] 일 구현예로, 상기 엔지니어링 된 스캐폴드 영역은 변형된 제1 영역, 및 변형된 제4 영역 및 제5 영역을 포함할 수 있다.

[434] 일 구현예로, 상기 엔지니어링 된 스캐폴드 영역은 변형된 제2 영역, 및 변형된 제4 영역 및 제5 영역을 포함할 수 있다.

[435] 일 구현예로, 상기 엔지니어링 된 스캐폴드 영역은 변형된 제1 영역, 변형된 제2

영역, 및 변형된 제4 영역 및 제5 영역을 포함할 수 있다.

[436] 이때, 상기 변형된 영역은 전술한 각 영역의 변형 단락에서 설명된 바와 같다.

[437] 각 변형의 조합 1 - 제1 영역 변형 + 제2 영역 변형

[438] 일 구현예로, 상기 엔지니어링 된 스캐폴드 영역은 변형된 제1 영역 및 변형된 제2 영역을 포함한다. 이때, 상기 변형된 제1 영역은 "엔지니어링 된 스캐폴드 영역 1 - 제1 영역 변형" 단락에서 설명된 변형을 모두 포함한다. 이때, 상기 변형된 제2 영역은 "엔지니어링 된 스캐폴드 영역 2 - 제2 영역 변형" 단락에서 설명된 변형을 모두 포함한다.

[439] 일 구현예로, 제1 영역 및 제2 영역이 변형된 엔지니어링 된 스캐폴드 서열은 다음을 포함할 수 있다:

[440] 5'말단에서 3'말단 방향으로,

[441] 5'-A-3', 5'-AA-3', 5'-GAA-3', 5'-AGAA-3', 5'-GAGAA-3', 5'-GGAGAA-3', 5'-UGGAGAA-3', 5'-GUGGAGAA-3', 5'-AGUGGAGAA-3', 서열번호 16 내지 26으로 이루어진 군에서 선택된 서열,

[442] 서열번호 38 내지 서열번호 49, 및 서열번호 430 내지 서열번호 431로 이루어진 군에서 선택된 서열,

[443] 서열번호 11, 및

[444] 서열번호 12이 연결된 서열; 및

[445] 5'말단에서 3'말단 방향으로, 서열번호 14 및 5'-AUGCAAC-3'가 연결된 서열.

[446] 일 구현예로, 제1 영역 및 제2 영역이 변형된 엔지니어링 된 스캐폴드 서열은 다음을 포함할 수 있다:

[447] 5'말단에서 3'말단 방향으로,

[448] 5'-ACCGCUUCACCAUUAGUGAGUGAAGGUGGGCUGCUUGCAUCAGCCUA AUGUCGAGAAGUGCUUUCUUCGGAAAGUAACCCUCGAAACAAAUUCAUU U-3'(서열번호 156); 및

[449] 5'-GAAUGAAGGAAUGCAAC-3'(서열번호 3).

[450] 일 구현예로, 제1 영역 및 제2 영역이 변형된 엔지니어링 된 스캐폴드 영역의 서열은 5'에서 3'말단 방향으로,

[451] 5'-A-3', 5'-AA-3', 5'-GAA-3', 5'-AGAA-3', 5'-GAGAA-3', 5'-GGAGAA-3', 5'-UGGAGAA-3', 5'-GUGGAGAA-3', 5'-AGUGGAGAA-3', 서열번호 16 내지 26으로 이루어진 군에서 선택된 서열,

[452] 서열번호 38 내지 서열번호 49, 및 서열번호 430 내지 서열번호 431로 이루어진 군에서 선택된 서열,

[453] 서열번호 11,

[454] 서열번호 12,

[455] 링커,

[456] 서열번호 14, 및

[457] 5'-AUGCAAC-3'가 연결된 것일 수 있다.

- [458] 이때, 상기 링커는 5'-GAAA-3'일 수 있다.
- [459] 일 구현예로, 제1 영역 및 제2 영역이 변형된 엔지니어링 된 스캐폴드 영역의 서열은
 5'-ACCGCUUCACCAUAGUGAGUGAAGGUGGGCUGCUUGCAUCAGCCUAA
 UGUCGAGAAGUGCUUUCUUCGGAAAGUAACCCUCGAAACAAAUUCAUUU
 GAAAGAAUGAAGGAAUGCAAC-3'(서열번호 206)일 수 있다.
- [460] 각 변형의 조합 2 - 제1 영역 변형 + 제4 영역 및 제5 영역 변형
- [461] 일 구현예로, 상기 엔지니어링 된 스캐폴드 영역은 변형된 제1 영역, 및 변형된 제4 영역 및 제5 영역을 포함한다. 이때, 상기 변형된 제1 영역은 "엔지니어링 된 스캐폴드 영역 1 - 제1 영역 변형" 단락에서 설명된 변형을 모두 포함한다. 이때, 상기 변형된 제4 영역 및 제5 영역은 "엔지니어링 된 스캐폴드 영역 3 - 제4 영역 및 제5 영역 변형" 단락에서 설명된 변형을 모두 포함한다.
- [462] 일 구현예로, 제1 영역, 및 제4 영역 및 제5 영역이 변형된 엔지니어링 된 스캐폴드 서열은 다음을 포함할 수 있다:
- [463] 5'말단에서 3'말단 방향으로,
- [464] 5'-A-3', 5'-AA-3', 5'-GAA-3', 5'-AGAA-3', 5'-GAGAA-3', 5'-GGAGAA-3',
 5'-UGGAGAA-3', 5'-GUGGAGAA-3', 5'-AGUGGAGAA-3', 서열번호 16 내지 26으로 이루어진 군에서 선택된 서열,
- [465] 서열번호 10,
- [466] 서열번호 11, 및
- [467] 5'-AACAAA-3', 5'-AACAAAU-3', 5'-AACAAAUU-3', 5'-AACAAAUUC-3',
 서열번호 66 내지 68로 이루어진 군에서 선택된 서열이 연결된 서열; 및
- [468] 5'말단에서 3'말단 방향으로,
- [469] 5'-GGA-3', 5'-AGGA-3', 5'-AAGGA-3', 5'-GAAGGA-3', 5'-UGAAGGA-3',
 5'-AUGAAGGA-3', 및 5'-AAUGAAGGA-3'로 이루어진 군에서 선택된 서열, 및
- [470] 5'-AUGCAAC-3'가 연결된 서열.
- [471] 일 구현예로, 제1 영역, 및 제4 영역 및 제5 영역이 변형된 엔지니어링 된 스캐폴드 서열은 다음을 포함할 수 있다:
- [472] 5'말단에서 3'말단 방향으로,
- [473] 5'-ACCGCUUCACCAAAAGCUGUCCCUUAGGGGAUUAGAACUUGAGUGA
 AGGUGGGCUGCUUGCAUCAGCCUAAUGUCGAGAAGUGCUUUCUUCGGAA
 AGUAACCCUCGAAACAAA-3'(서열번호 157); 및
- [474] 5'-GGAAUGCAAC-3'(서열번호 160).
- [475] 일 구현예로, 제1 영역 및 제4 영역 및 제5 영역이 변형된 엔지니어링 된 스캐폴드 영역의 서열은 5'에서 3'말단 방향으로,
- [476] 5'-A-3', 5'-AA-3', 5'-GAA-3', 5'-AGAA-3', 5'-GAGAA-3', 5'-GGAGAA-3',
 5'-UGGAGAA-3', 5'-GUGGAGAA-3', 5'-AGUGGAGAA-3', 서열번호 16 내지 26으로 이루어진 군에서 선택된 서열,

- [477] 서열번호 10,
 [478] 서열번호 11,
 [479] 서열번호 110 내지 116에서 선택된 서열, 및
 [480] 5'-AUGCAAC-3'가 연결된 것일 수 있다.
 [481] 일 구현예로, 제1 영역 및 제4 영역 및 제5 영역이 변형된 엔지니어링 된 스캐폴드 영역의 서열은
 5'-ACCGCUUCACCAAAAGCUGUCCCUUAGGGGAUUAGAACUUGAGUGAA
 GGUGGGCUGCUUGCAUCAGCCUAAUGUCGAGAAGUGCUUUCUUCGAAAA
 GUAACCCUCGAAACAAAGAAAGGAAUGCAAC-3'(서열번호 207)일 수 있다.
 [482] 각 변형의 조합 3 - 제2 영역 변형 + 제4 영역 및 제5 영역 변형
 [483] 일 구현예로, 상기 엔지니어링 된 스캐폴드 영역은 변형된 제2 영역 및 변형된 제4 영역 및 제5 영역을 포함한다. 이때, 상기 변형된 제2 영역은 "엔지니어링 된 스캐폴드 영역 2 - 제2 영역 변형" 단락에서 설명된 변형을 모두 포함한다. 이때, 상기 변형된 제4 영역 및 제5 영역은 "엔지니어링 된 스캐폴드 영역 3 - 제4 영역 및 제5 영역 변형" 단락에서 설명된 변형을 모두 포함한다.
 [484] 일 구현예로, 제2 영역, 및 제4 영역 및 제5 영역이 변형된 엔지니어링 된 스캐폴드 서열은 다음을 포함할 수 있다:
 [485] 5'말단에서 3'말단 방향으로,
 [486] 서열번호 9,
 [487] 서열번호 38 내지 서열번호 49, 및 서열번호 430 내지 서열번호 431로 이루어진 군에서 선택된 서열,
 [488] 서열번호 11, 및
 [489] 5'-AACAAA-3', 5'-AACAAAU-3', 5'-AACAAAUU-3', 5'-AACAAAUUC-3', 서열번호 66 내지 68로 이루어진 군에서 선택된 서열이 연결된 서열; 및
 [490] 5'말단에서 3'말단 방향으로,
 [491] 5'-GGA-3', 5'-AGGA-3', 5'-AAGGA-3', 5'-GAAGGA-3', 5'-UGAAGGA-3', 5'-AUGAAGGA-3', 및 5'-AAUGAAGGA-3'로 이루어진 군에서 선택된 서열, 및
 [492] 5'-AUGCAAC-3'가 연결된 서열.
 [493] 일 구현예로, 제2 영역, 및 제4 영역 및 제5 영역이 변형된 엔지니어링 된 스캐폴드 서열은 다음을 포함할 수 있다:
 [494] 5'말단에서 3'말단 방향으로,
 [495] 5'-CUUCACUGAUAAAGUGGAGAACCGCUUCACCAUUAGUGAGUGAAGG
 UGGGCUGCUUGCAUCAGCCUAAUGUCGAGAAGUGCUUUCUUCGGAAGU
 AACCCUCGAAACAAA-3'(서열번호 158); 및
 [496] 5'-GGAAUGCAAC-3'(서열번호 160).
 [497] 일 구현예로, 제2 영역 및 제4 영역 및 제5 영역이 변형된 엔지니어링 된 스캐폴드 영역의 서열은 5'에서 3'말단 방향으로,
 [498] 서열번호 9,

- [499] 서열번호 38 내지 서열번호 49, 및 서열번호 430 내지 서열번호 431로 이루어진 군에서 선택된 서열,
- [500] 서열번호 11,
- [501] 서열번호 110 내지 116에서 선택된 서열, 및
- [502] 5'-AUGCAAC-3'가 연결된 것일 수 있다.
- [503] 일 구현예로, 제2 영역 및 제4 영역 및 제5 영역이 변형된 엔지니어링 된 스캐폴드 영역의 서열은
 5'-CUUCACUGAUAAAGUGGAGAACCGCUUCACCAUUAGUGAGUGAAGGU
 GGGCUGCUUGCAUCAGCCUAAUGUCGAGAAGUGCUUUCUUCGGAAAGUA
 ACCCUCGAAACAAAGAAAGGAAUGCAAC-3'(서열번호 208)일 수 있다.
- [504] 각 변형의 조합 4 - 제1 영역 변형+ 제2 영역 변형+ 제4 영역 및 제5 영역 변형
- [505] 일 구현예로, 상기 엔지니어링 된 스캐폴드 영역은 변형된 제1 영역, 변형된 제2 영역 및 변형된 제4 영역 및 제5 영역을 포함한다. 이때, 상기 변형된 제1 영역은 "엔지니어링 된 스캐폴드 영역 1 - 제1 영역 변형" 단락에서 설명된 변형을 모두 포함한다. 이때, 상기 변형된 제2 영역은 "엔지니어링 된 스캐폴드 영역 2 - 제2 영역 변형" 단락에서 설명된 변형을 모두 포함한다. 이때, 상기 변형된 제4 영역 및 제5 영역은 "엔지니어링 된 스캐폴드 영역 3 - 제4 영역 및 제5 영역 변형" 단락에서 설명된 변형을 모두 포함한다.
- [506] 일 구현예로, 제1 영역, 제2 영역, 및 제4 영역 및 제5 영역이 변형된 엔지니어링 된 스캐폴드 서열은 다음을 포함할 수 있다:
- [507] 5'말단에서 3'말단 방향으로,
- [508] 5'-A-3', 5'-AA-3', 5'-GAA-3', 5'-AGAA-3', 5'-GAGAA-3', 5'-GGAGAA-3', 5'-UGGAGAA-3', 5'-GUGGAGAA-3', 5'-AGUGGAGAA-3', 서열번호 16 내지 26으로 이루어진 군에서 선택된 서열,
- [509] 서열번호 38 내지 서열번호 49, 및 서열번호 430 내지 서열번호 431로 이루어진 군에서 선택된 서열,
- [510] 서열번호 11, 및
- [511] 5'-AACAAA-3', 5'-AACAAAU-3', 5'-AACAAAUU-3', 5'-AACAAAUUC-3', 서열번호 66 내지 68로 이루어진 군에서 선택된 서열이 연결된 서열; 및
- [512] 5'말단에서 3'말단 방향으로,
- [513] 5'-GGA-3', 5'-AGGA-3', 5'-AAGGA-3', 5'-GAAGGA-3', 5'-UGAAGGA-3', 5'-AUGAAGGA-3', 및 5'-AAUGAAGGA-3'로 이루어진 군에서 선택된 서열, 및
- [514] 5'-AUGCAAC-3'가 연결된 서열.
- [515] 일 구현예로, 제1 영역, 제2 영역, 및 제4 영역 및 제5 영역이 변형된 엔지니어링 된 스캐폴드 서열은 다음을 포함할 수 있다:
- [516] 5'말단에서 3'말단 방향으로,
- [517] 5'-ACCGCUUCACCAUUAGUGAGUGAAGGUGGGCUGCUUGCAUCAGCCUA
 AUGUCGAGAAGUGCUUUCUUCGGAAAGUAACCCUCGAAACAAA-3'(서열번호

호 159); 및

[518] 5'-GGAAUGCAAC-3'(서열번호 160).

[519] 일 구현예로, 제1 영역, 제2 영역 및 제4 영역 및 제5 영역이 변형된 엔지니어링 된 스캐폴드 영역의 서열은 5'에서 3'말단 방향으로,

[520] 5'-A-3', 5'-AA-3', 5'-GAA-3', 5'-AGAA-3', 5'-GAGAA-3', 5'-GGAGAA-3', 5'-UGGAGAA-3', 5'-GUGGAGAA-3', 5'-AGUGGAGAA-3', 서열번호 16 내지 26으로 이루어진 군에서 선택된 서열,

[521] 서열번호 38 내지 서열번호 49, 및 서열번호 430 내지 서열번호 431로 이루어진 군에서 선택된 서열,

[522] 서열번호 11,

[523] 서열번호 110 내지 116에서 선택된 서열, 및

[524] 5'-AUGCAAC-3'가 연결된 것일 수 있다.

[525] 일 구현예로, 제1 영역, 제2 영역 및 제4 영역 및 제5 영역이 변형된 엔지니어링 된 스캐폴드 영역의 서열은

5'-ACCGCUUCACCAUUAGUGAGUGAAGGUGGGCUGCUUGCAUCAGCCUAA
UGUCGAGAAGUGCUUUCUUCGGAAGUAACCCUCGAAACAAAGAAAGGA
AUGCAAC-3'(서열번호 209)일 수 있다.

[526] 각 변형의 조합 5 - 제3 영역, 및 제6 영역의 추가적인 변형

[527] 전술한 바, 제3 영역 및 제6 영역 또한 그 기능이 손상되지 않는 범위 내에서 변형될 수 있으므로, 본 명세서에서 제공하는 엔지니어링 된 스캐폴드 영역은 전술한 제1 영역, 제2 영역, 제4 영역, 및/또는 제5 영역의 변형 외, 제3 영역 및/또는 제6 영역이 추가적으로 변형된 것일 수 있다.

[528]

[529] 엔지니어링 된 스캐폴드 영역 7 - 상동성 있는 서열 포함

[530] 본 명세서에서 제공하는 엔지니어링 된 스캐폴드 영역은 "엔지니어링 된 스캐폴드 영역 1 - 제1 영역 변형", "엔지니어링 된 스캐폴드 영역 2 - 제2 영역 변형", "엔지니어링 된 스캐폴드 영역 3 - 제3 영역 변형", "엔지니어링 된 스캐폴드 영역 4 - 제4 영역 및 제5 영역 변형", 및 "엔지니어링 된 스캐폴드 영역 5 - 각 변형의 조합" 단락에서 서술된 엔지니어링 된 스캐폴드 영역(이하, 전술한 엔지니어링 된 스캐폴드 영역)의 서열과 동일성(identity)을 가지는 서열을 포함한다.

[531] 일 구현예로, 상기 엔지니어링 된 스캐폴드 영역의 서열은 전술한 엔지니어링 된 스캐폴드 영역의 서열 중 어느 하나와 100%, 99%, 98%, 97%, 96%, 95%, 94%, 93%, 92%, 91%, 90%, 89%, 88%, 87%, 86%, 85%, 84%, 83%, 82%, 81%, 80%, 79%, 78%, 77%, 76%, 75%, 74%, 73%, 72%, 71%, 70%, 69%, 68%, 67%, 66%, 65%, 64%, 63%, 62%, 61%, 60%, 59%, 58%, 57%, 56%, 55%, 54%, 53%, 52%, 51%, 또는 50%의 서열 동일성(sequence identity) 또는 서열 상동성(sequence homology)을 가지는 서열일 수 있다. 일 구현예로, 상기 스캐폴드 서열은 전술한 엔지니어링

된 스캐폴드 영역의 서열 중 어느 하나와 바로 이전 문장에서 선택된 두 수치 범위 내의 %로 일치하는 서열일 수 있다. 예를 들어, 상기 스캐폴드 서열은 전술한 엔지니어링 된 스캐폴드 영역의 서열 중 어느 하나와 90% 내지 100% 일치하는 서열일 수 있다.

[532]

[533] 엔지니어링 된 Cas12f1 가이드 RNA

[534] 엔지니어링 된 Cas12f1 가이드 RNA 개관

[535] 본 명세서에서는 CRISPR/Cas12f1 시스템의 세포 내 유전자 편집 효율을 높이기 위한, 엔지니어링 된 Cas12f1 가이드 RNA를 제공한다. 상기 엔지니어링 된 Cas12f1 가이드 RNA는 엔지니어링 된 스캐폴드, 및 스페이서를 포함한다. 이때, 상기 엔지니어링 된 스캐폴드는 전술한 "엔지니어링 된 스캐폴드 영역"에서 설명된 것 중 어느 하나일 수 있다.

[536] 싱글 가이드 RNA 또는 듀얼 가이드 RNA

[537] 상기 엔지니어링 된 Cas12f1 가이드 RNA는 싱글 가이드 RNA 또는 듀얼 가이드 RNA일 수 있다. 상기 듀얼 가이드 RNA는 가이드 RNA가 tracrRNA 및 crRNA의 독립적인 두 분자 RNA로 구성된 것을 의미한다. 상기 싱글 가이드 RNA는 (엔지니어링 된) tracrRNA의 3'말단 및 (엔지니어링 된) crRNA의 5'말단이 링커를 통해 연결되어 하나의 분자를 형성한 것을 의미한다. 달리 표현하면, 상기 듀얼 가이드 RNA에서, 엔지니어링 된 스캐폴드에 포함된 제4 영역의 3'말단 및 제5 영역의 5'말단이 링커를 통해 연결된 것을 의미한다. 이때, 엔지니어링 된 스캐폴드의 각 영역은 "엔지니어링 된 스캐폴드 영역" 단락들에서 설명된 변형, 및 그 구체적인 서열을 모두 포함할 수 있다.

[538] 엔지니어링 된 싱글 가이드 RNA 예시 1

[539] 일 구현예로, 상기 엔지니어링 된 Cas12f1 가이드 RNA는 5'말단에서 3'말단 방향으로, 엔지니어링 된 스캐폴드 영역, 및 스페이서가 순서대로 연결된 것일 수 있다.

[540] 상기 스페이서는 10 내지 50 뉴클레오타이드 길이를 가지며, 표적 서열과 상보적인 서열을 가진다.

[541] 상기 엔지니어링 된 스캐폴드 영역은 5'말단에서 3'말단 방향으로, 자연계에서 발견되는 스캐폴드 영역과 대응되는 제1 영역, 제2 영역, 제3 영역, 제4 영역, 링커, 제5 영역, 제6 영역이 순서대로 연결된 것이며, 자연계에서 발견되는 스캐폴드 영역과 비교해 제1 영역, 제2 영역, 제4 영역, 및 제5 영역에서 선택된 하나 이상의 영역이 변형된 것이다.

[542] 일 예로, 상기 엔지니어링 된 스캐폴드 영역의 제1 영역이 변형된 경우, 상기 변형된 제1 영역은 자연계에서 발견되는 스캐폴드 영역의 제1 영역에서 하나 이상의 뉴클레오타이드가 제거된 것일 수 있다. 이때, 상기 제거된 뉴클레오타이드는 상기 제1 영역 중 Stem 1 (Takeda et al., Structure of the miniature type V-F CRISPR-Cas effector enzyme, Molecular Cell 81, 1-13 (2021))에

속하는 뉴클레오타이드일 수 있다. 이때, 상기 변형된 제1 영역의 서열은 5'-A-3'을 포함하는 것을 특징으로 한다.

- [543] 또 다른 예로, 상기 엔지니어링 된 스캐폴드 영역의 제2 영역이 변형된 경우, 상기 변형된 제2 영역은 자연계에서 발견되는 스캐폴드 영역의 제2 영역에서 하나 이상의 뉴클레오타이드가 제거된 것일 수 있다. 이때, 상기 뉴클레오타이드의 제거는 상기 제2 영역 중 Stem 2 구조(Takeda et al., Structure of the miniature type V-F CRISPR-Cas effector enzyme, Molecular Cell 81, 1-13 (2021))를 형성하는 부분에서 일어난 것이고, 서로 상보적인 페어를 이루는 뉴클레오타이드가 쌍 단위로 제거된 것일 수 있다. 이때, 상기 변형된 제2 영역의 서열은 적어도 5'-CCGCUUCAC-3'(서열번호 432) 및 5'-UGAGUGAAGG-3'(서열번호 433)을 포함하는 것을 특징으로 한다. 더 구체적으로, 상기 변형된 제2 영역의 서열은 5'말단에서 3'말단 방향으로 5'-CCGCUUCAC-3'(서열번호 432) 및 5'-UGAGUGAAGG-3'(서열번호 433)가 순서대로 연결되어 있을 수 있으며, 적절한 중간 서열을 통해 연결되어 있을 수 있다. 일 예로, 상기 중간 서열은 5'-UUAG-3', 5'-AUUAGU-3', 5'-AAUUAGCU-3', 5'-AAAUUAGACU-3'(서열번호 57), 5'-AAAGUUAGAACU-3'(서열번호 58), 5'-AAAGCUUAGGAACU-3'(서열번호 59), 5'-AAAGCUUUAGAGAACU-3'(서열번호 60), 5'-AAAGCUGUUAGUUAGAACU-3'(서열번호 61), 5'-AAAGCUGUUAGUAGAACU-3'(서열번호 62), 5'-AAAGCUGUUUAGAUUAGAACU-3'(서열번호 63), 5'-AAAGCUGUCUUAGGAUUAGAACU-3'(서열번호 64), 5'-AAAGCUGUCCUUAGGGAUUAGAACU-3'(서열번호 65), 5'-AAAAGCUGUCCCUUAGGGGAUUAGAACU-3'(서열번호 434), 및 5'-CAAAAGCUGUCCCUUAGGGGAUUAGAACUUG-3'(서열번호 435)로 이루어진 군에서 선택된 것일 수 있다.

- [544] 또 다른 예로, 상기 엔지니어링 된 스캐폴드 영역의 제4 영역 및 제5 영역이 변형된 경우, 상기 변형된 제4 영역 및 제5 영역은 자연계에서 발견되는 스캐폴드 영역 중 제4 영역 및/또는 제5 영역의 하나 이상의 뉴클레오타이드가 제거된 것일 수 있다. 이때, 상기 뉴클레오타이드의 제거는 상기 제4 영역 및 제5 영역 중 Stem 5 (R:AR-2) 구조(Takeda et al., Structure of the miniature type V-F CRISPR-Cas effector enzyme, Molecular Cell 81, 1-13 (2021))를 형성하는 부분에서 일어난 것이고, 서로 상보적인 페어를 이루는 뉴클레오타이드가 쌍 단위로 제거된 것일 수 있다. 이때, 상기 변형된 제4 영역의 서열은 적어도 5'-AACAAA-3'을 포함하는 것을 특징으로 한다. 이때, 상기 변형된 제5 영역의 서열은 적어도 5'-GGA-3'을 포함하는 것을 특징으로 한다.

- [545] 엔지니어링 된 싱글 가이드 RNA 예시 2

- [546] 일 구현예로, 상기 엔지니어링 된 Cas12f1 가이드 RNA는 5'말단에서 3'말단

방향으로, 엔지니어링 된 스캐폴드 영역, 및 스페이서가 순서대로 연결된 것일 수 있다.

[547] 상기 스페이서는 10 내지 50 뉴클레오타이드 길이를 가지며, 표적 서열과 상보적인 서열을 가진다.

[548] 상기 엔지니어링 된 스캐폴드 영역의 서열은 5'말단에서 3'말단 방향으로 다음 서열이 순서대로 연결된 것이다:

[549] 5'-A-3', 5'-AA-3', 5'-GAA-3', 5'-AGAA-3', 5'-GAGAA-3', 5'-GGAGAA-3', 5'-UGGAGAA-3', 5'-GUGGAGAA-3', 5'-AGUGGAGAA-3', 5'-AAGUGGAGAA-3'(서열번호 16), 5'-AAAGUGGAGAA-3'(서열번호 17), 5'-UAAAGUGGAGAA-3'(서열번호 18), 5'-AUAAAGUGGAGAA-3'(서열번호 19), 5'-GAUAAAGUGGAGAA-3'(서열번호 20), 5'-UGAUAAAGUGGAGAA-3'(서열번호 21), 5'-CUGAUAAAGUGGAGAA-3'(서열번호 22), 5'-ACUGAUAAAGUGGAGAA-3'(서열번호 23), 5'-CACUGAUAAAGUGGAGAA-3'(서열번호 24), 5'-UCACUGAUAAAGUGGAGAA-3'(서열번호 25), 5'-UUCACUGAUAAAGUGGAGAA-3'(서열번호 26), 및 5'-CUUCACUGAUAAAGUGGAGAA-3'(서열번호 9)로 이루어진 군에서 선택된 서열;

[550] 5'-CCGCUUCACUAGAGUGAAGGUGG-3'(서열번호 430), 5'-CCGCUUCACCUAGGAGUGAAGGUGG-3'(서열번호 431), 5'-CCGCUUCACCAUAGUGAGUGAAGGUGG-3'(서열번호 38), 5'-CCGCUUCACCAAUAGUUGAGUGAAGGUGG-3'(서열번호 39), 5'-CCGCUUCACCAAAUAGCUUGAGUGAAGGUGG-3'(서열번호 40), 5'-CCGCUUCACCAAAAUAGACUUGAGUGAAGGUGG-3'(서열번호 41), 5'-CCGCUUCACCAAAAGUAGAACUUGAGUGAAGGUGG-3'(서열번호 42), 5'-CCGCUUCACCAAAAGCUUAGGAACUUGAGUGAAGGUGG-3'(서열번호 43), 5'-CCGCUUCACCAAAAGCUUUAGAGAACUUGAGUGAAGGUGG-3'(서열번호 44), 5'-CCGCUUCACCAAAAGCUGUUAGUAGAACUUGAGUGAAGGUGG-3'(서열번호 45), 5'-CCGCUUCACCAAAAGCUGUUAGUAGAACUUGAGUGAAGGUGG-3'(서열번호 46), 5'-CCGCUUCACCAAAAGCUGUUUAGAUUAGAACUUGAGUGAAGGUGG-3'(서열번호 47), 5'-CCGCUUCACCAAAAGCUGUCUUAGGAUUAGAACUUGAGUGAAGGUGG-3'(서열번호 48),

- 5'-CCGCUUCACCAAAAGCUGUCCUUAGGGAUUAGAACUUGAGUGAAGGUGG-3'(서열번호 49), 및
- 5'-CCGCUUCACCAAAAGCUGUCCCUUAGGGGAUUAGAACUUGAGUGAAGGUGG-3'(서열번호 10)로 이루어진 군에서 선택된 서열;
- [551] 5'-GCUGCUUGCAUCAGCCUAAUGUCGAGAAGUGCUUUCUUCGGAAAGUAACCCUCGA-3'(서열번호 11);
- [552] 5'-AACAAAGAAAGGA-3'(서열번호 110),
5'-AACAAAUGAAAAGGA-3'(서열번호 111),
5'-AACAAAUUGAAAAAGGA-3'(서열번호 112),
5'-AACAAAUUCGAAAGAAGGA-3'(서열번호 113),
5'-AACAAAUUCAGAAAUGAAGGA-3'(서열번호 114),
5'-AACAAAUUCAUGAAAAUGAAGGA-3'(서열번호 115),
5'-AACAAAUUCAUUGAAAAAUGAAGGA-3'(서열번호 116), 및
5'-AACAAAUUCAUUUGAAAGAAUGAAGGA-3'(서열번호 117)에서 선택된 서열; 및
- [553] 5'-AUGCAAC-3',
- [554] 이때, 상기 엔지니어링 된 스캐폴드 영역의 서열은
5'-CUUCACUGAUAAAGUGGAGAACCGCUUCACCAAAAGCUGUCCCUUAGGGAUUAGAACUUGAGUGAAGGUGGGCUGCUUGCAUCAGCCUAAUGUCGA GAAGUGCUUUCUUCGGAAAGUAACCCUCGAAACAAAUUCAUUUGAAAGA AUGAAGGAAUGCAAC-3'(서열번호 7)과 상이한 것을 특징으로 한다.
- [555] 엔지니어링 된 싱글 가이드 RNA 예시 3
- [556] 일 구현예로, 상기 엔지니어링 된 Cas12f1 가이드 RNA는 5'말단에서 3'말단 방향으로, 엔지니어링 된 스캐폴드 영역, 및 스페이서가 순서대로 연결된 것일 수 있다.
- [557] 상기 스페이서는 10 내지 50 뉴클레오타이드 길이를 가지며, 표적 서열과 상보적인 서열을 가진다. 예를 들어, 10 개, 11 개, 12 개, 13 개, 14 개, 15 개, 16 개, 17 개, 18 개, 19 개, 20 개, 21 개, 22 개, 23 개, 24 개, 25 개, 26 개, 27 개, 28 개, 29 개, 30 개, 31 개, 32 개, 33 개, 34 개, 35 개, 36 개, 37 개, 38 개, 39 개 또는 40 개의 뉴클레오타이드 길이를 가질 수 있다.
- [558] 상기 엔지니어링 된 스캐폴드 영역의 서열은 5'말단에서 3'말단 방향으로 다음 서열이 순서대로 연결된 것이다:
- [559] 5'-A-3', 5'-AA-3', 5'-GAA-3', 5'-AGAA-3', 5'-GAGAA-3', 5'-GGAGAA-3',
5'-UGGAGAA-3', 5'-GUGGAGAA-3', 5'-AGUGGAGAA-3',
5'-AAGUGGAGAA-3'(서열번호 16), 5'-AAAGUGGAGAA-3'(서열번호 17),
5'-UAAAGUGGAGAA-3'(서열번호 18), 5'-AUAAAGUGGAGAA-3'(서열번호 19),
5'-GAUAAAGUGGAGAA-3'(서열번호 20),
5'-UGAUAAAGUGGAGAA-3'(서열번호 21),

5'-CUGAUAAAGUGGAGAA-3'(서열번호 22),
 5'-ACUGAUAAAGUGGAGAA-3'(서열번호 23),
 5'-CACUGAUAAAGUGGAGAA-3'(서열번호 24),
 5'-UCACUGAUAAAGUGGAGAA-3'(서열번호 25),
 5'-UUCACUGAUAAAGUGGAGAA-3'(서열번호 26), 및
 5'-CUUCACUGAUAAAGUGGAGAA-3'(서열번호 9)로 이루어진 군에서 선택된 서열;

- [560] 5'-CCGCUUCACUUAGAGUGAAGGUGG-3'(서열번호 430),
 5'-CCGCUUCACCUUAGGAGUGAAGGUGG-3'(서열번호 431),
 5'-CCGCUUCACCAUUAGUGAGUGAAGGUGG-3'(서열번호 38),
 5'-CCGCUUCACCAAUUAGUUGAGUGAAGGUGG-3'(서열번호 39),
 5'-CCGCUUCACCAAAUUAGCUUGAGUGAAGGUGG-3'(서열번호 40),
 5'-CCGCUUCACCAAAAUUAGACUUGAGUGAAGGUGG-3'(서열번호 41),
 5'-CCGCUUCACCAAAAAGUUAGAACUUGAGUGAAGGUGG-3'(서열번호 42),
 5'-CCGCUUCACCAAAAAGCUUAGGAACUUGAGUGAAGGUGG-3'(서열번호 43),
 5'-CCGCUUCACCAAAAAGCUUUAGAGAACUUGAGUGAAGGUGG-3'(서열번호 44),
 5'-CCGCUUCACCAAAAAGCUGUUAGUUAGAACUUGAGUGAAGGUGG-3'(서열번호 45),
 5'-CCGCUUCACCAAAAAGCUGUUAGUAGAACUUGAGUGAAGGUGG-3'(서열번호 46),
 5'-CCGCUUCACCAAAAAGCUGUUUAGAUUAGAACUUGAGUGAAGGUGG-3'(서열번호 47),
 5'-CCGCUUCACCAAAAAGCUGUCUUAGGAUUAGAACUUGAGUGAAGGUGG-3'(서열번호 48),
 5'-CCGCUUCACCAAAAAGCUGUCCUUAGGGAUUAGAACUUGAGUGAAGGUGG-3'(서열번호 49), 및
 5'-CCGCUUCACCAAAAAGCUGUCCCUUAGGGGAUUAGAACUUGAGUGAAGGUGG-3'(서열번호 10)로 이루어진 군에서 선택된 서열;

- [561] 5'-GCUGCUUGCAUCAGCCUAAUGUCGAGAAGUGCUUUCUUCGGAAAGUAACCCUCGA-3'(서열번호 11);

- [562] 5'-AACAAAGAAAGGA-3'(서열번호 110),
 5'-AACAAUUGAAAAGGA-3'(서열번호 111),
 5'-AACAAUUGAAAAAGGA-3'(서열번호 112),
 5'-AACAAUUCGAAAGAAGGA-3'(서열번호 113),
 5'-AACAAUUCAGAAAUGAAGGA-3'(서열번호 114),
 5'-AACAAUUC AUGAAAUGAAGGA-3'(서열번호 115),

5'-AACAAAUUCAUUGAAAAUGAAGGA-3'(서열번호 116),
 5'-AACAAAUUCAUUUGAAAGAAUGAAGGA-3'(서열번호 117),
 5'-AACAAAUUCAUUUUGAAACGAAUGAAGGA-3'(서열번호 293),
 5'-AACAAAUUCAUUUUUGAAAACGAAUGAAGGA-3'(서열번호 294),
 5'-AACAAAUUCAUUUUUCGAAAGACGAAUGAAGGA-3'(서열번호 295),
 5'-AACAAAUUCAUUUUUCGAAAAGACGAAUGAAGGA-3'(서열번호 296),
 5'-AACAAAUUCAUUUUUCUGAAAUAGACGAAUGAAGGA-3'(서열번호 297),
 5'-AACAAAUUCAUUUUUCUCGAAAAGACGAAUGAAGGA-3'(서열번호 298),
 5'-AACAAAUUCAUUUUUCUCUGAAAAUAGACGAAUGAAGGA-3'(서열번호 299),
 5'-AACAAAUUCAUUUUUCUCUGAAAGAAUAGACGAAUGAAGGA-3'(서열번호 300),
 5'-AACAAAUUCAUUUUUCUCUCCGAAACGAAUAGACGAAUGAAGGA-3'(서열번호 301),
 5'-AACAAAUUCAUUUUUCUCUCCAGAAACCGAAUAGACGAAUGAAGGA-3'(서열번호 302),
 5'-AACAAAUUCAUUUUUCUCUCCAAGAAACCCGAAUAGACGAAUGAAGGA-3'(서열번호 303),
 5'-AACAAAUUCAUUUUUCUCUCCAUGAAAACCCGAAUAGACGAAUGAAGGA-3'(서열번호 304),
 5'-AACAAAUUCAUUUUUCUCUCCAUAUGAAAACCCGAAUAGACGAAUGAAGGA-3'(서열번호 305),
 5'-AACAAAUUCAUUUUUCUCUCCAUAUCGAAAGAACCCGAAUAGACGAAUGAAGGA-3'(서열번호 306),
 5'-AACAAAUUCAUUUUUCUCUCCAUAUCUGAAAAGAACCCGAAUAGACGAAUGAAGGA-3'(서열번호 307),
 5'-AACAAAUUCAUUUUUCUCUCCAUAUCUGGAAACAGAACCCGAAUAGACGAAUGAAGGA-3'(서열번호 308),
 5'-AACAAAUUCAUUUUUCUCUCCAUAUCUGCGAAAGCAGAACCCGAAUAGACGAAUGAAGGA-3'(서열번호 309),
 5'-AACAAAUUCAUUUUUCUCUCCAUAUCUGCAGAAAUGCAGAACCCGAAUAGACGAAUGAAGGA-3'(서열번호 310),
 5'-AACAAAUUCAUUUUUCUCUCCAUAUCUGCACGAAAUUGCAGAACCCGAAUAGACGAAUGAAGGA-3'(서열번호 311),
 5'-AACAAAUUCAUUUUUCUCUCCAUAUCUGCACAGAAAGUUGCAGAACCCGAAUAGACGAAUGAAGGA-3'(서열번호 312),

5'-AACAAAUUCAUUUUCCUCUCCAAUUCUGCACAGAAAUUGCAGAACCC
GAAUAGACGAAUGAAGGA-3'(서열번호 313), 및

5'-AACAAAUUCAUUUUCCUCUCCAAUUCUGCACAAGAAAGUUGCAGAAC
CCGAAUAGACGAAUGAAGGA-3'(서열번호 314)로 이루어진 군에서 선택된
서열; 및

[563] 5'-AUGCAAC-3',

[564] 이때, 상기 엔지니어링 된 스캐폴드 영역의 서열은

5'-CUUCACUGAUAAAGUGGAGAACCGCUUCACCAAAAGCUGUCCCUUAGG
GGAUUAGAACUUGAGUGAAGGUGGGCUGCUUGCAUCAGCCUAAUGUCGA
GAAGUGCUUUCUUCGGAAAGUAACCCUCGAAACAAAUUCAUUUUUCCUC
UCCAAUUCUGCACAAGAAAGUUGCAGAACCCGAAUAGACGAAUGAAGGA
AUGCAAC-3'(서열번호 315)과 상이한 것을 특징으로 한다.

[565] 엔지니어링 된 싱글 가이드 RNA 예시 4

[566] 일 구현예로, 상기 엔지니어링 된 Cas12f1 가이드 RNA는 5'말단에서 3'말단
방향으로, 엔지니어링 된 스캐폴드 영역, 및 스페이서가 순서대로 연결된 것일
수 있다.

[567] 상기 스페이서는 10 내지 50 뉴클레오타이드 길이를 가지며, 표적 서열과
상보적인 서열을 가진다. 예를 들어, 10 개, 11 개, 12 개, 13 개, 14 개, 15 개, 16 개,
17 개, 18 개, 19 개, 20 개, 21 개, 22 개, 23 개, 24 개, 25 개, 26 개, 27 개, 28 개, 29
개, 30 개, 31 개, 32 개, 33 개, 34 개, 35 개, 36 개, 37 개, 38 개, 39 개 또는 40 개의
뉴클레오타이드 길이를 가질 수 있다.

[568] 상기 엔지니어링 된 스캐폴드 영역의 서열은 5'말단에서 3'말단 방향으로 다음
서열이 순서대로 연결된 것이다:

[569] 5'-A-3'로 표현되는 제1 서열;

[570] 5'-CCGCUUCAC-3'(서열번호 432)로 표현되는 제2 서열;

[571] 5'-UUAG-3'로 표현되는 제3 서열;

[572] 5'-UGAGUGAAGG-3'(서열번호 433)로 표현되는 제4 서열;

[573] 5'-GCUGCUUGCAUCAGCCUAAUGUCGAGAAGUGCUUUCUUCGGAAAGU
AACCCUCGA-3'(서열번호 11)로 표현되는 제5 서열;

[574] 5'-AACAAA-3'로 표현되는 제6 서열;

[575] 링커;

[576] 5'-GGA-3'로 표현되는 제7 서열; 및

[577] 5'-AUGCAAC-3'로 표현되는 제8 서열.

[578] 일 예로, 상기 링커는 5'-GAAA-3'일 수 있다.

[579] 또 다른 예로, 상기 링커는 5'-GAAA-3', 5'-UGAAAA-3', 5'-UUGAAAAA-3',
5'-UUCGAAAGAA-3'(서열번호 425), 5'-UUCAGAAAUGAA-3'(서열번호 426),
5'-UUCAUGAAAAUGAA-3'(서열번호 427),
5'-UUCAUUGAAAAAUGAA-3'(서열번호 428), 및

5'-UUCAUUUGAAAGAAUGAAGGA-3'(서열번호 429)로 이루어진 군에서 선택된 것일 수 있다.

- [580] 상기 구현예의 일 구체예로, 상기 엔지니어링 된 스캐폴드 영역의 서열은 5'-A-3', 5'-GA-3', 5'-AGA-3', 5'-GAGA-3', 5'-GGAGA-3', 5'-UGGAGA-3', 5'-GUGGAGA-3', 5'-AGUGGAGA-3', 5'-AAGUGGAGA-3', 5'-AAAGUGGAGA-3'(서열번호 27), 5'-UAAAGUGGAGA-3'(서열번호 28), 5'-AUAAAGUGGAGA-3'(서열번호 29), 5'-GAUAAAGUGGAGA-3'(서열번호 30), 5'-UGAUAAAGUGGAGA-3'(서열번호 31), 5'-CUGAUAAAGUGGAGA-3'(서열번호 32), 5'-ACUGAUAAAGUGGAGA-3'(서열번호 33), 5'-CACUGAUAAAGUGGAGA-3'(서열번호 34), 5'-UCACUGAUAAAGUGGAGA-3'(서열번호 35), 5'-UUCACUGAUAAAGUGGAGA-3'(서열번호 36), 및 5'-CUUCACUGAUAAAGUGGAGA-3'(서열번호 37)로 이루어진 군에서 선택된 제9 서열을 추가적으로 포함할 수 있다. 이때, 상기 제9 서열의 3'말단은 상기 제1 서열의 5'말단과 연결되어 있을 수 있다.

- [581] 상기 구현예의 또 다른 구체예로, 상기 엔지니어링 된 스캐폴드 영역의 서열은 5'-A-3', 5'-AA-3', 5'-AAA-3', 5'-AAAG-3', 5'-AAAGC-3', 5'-AAAGCU-3', 5'-AAAGCUG-3', 5'-AAAGCUGU-3', 5'-AAAGCUGUC-3', 5'-AAAGCUGUCC-3'(서열번호 52), 5'-AAAGCUGUCCC-3'(서열번호 53), 5'-AAAAGCUGUCCC-3'(서열번호 440), 및 5'-CAAAAGCUGUCCC-3'(서열번호 441)로 이루어진 군에서 선택된 제10 서열을 추가적으로 포함할 수 있다. 이때, 상기 제2 서열의 3'말단 및 상기 제3 서열의 5'말단은 상기 제10 서열을 통해 연결되어 있을 수 있다.

- [582] 상기 구현예의 또 다른 구체예로, 상기 엔지니어링 된 스캐폴드 영역의 서열은 5'-U-3', 5'-CU-3', 5'-ACU-3', 5'-AACU-3', 5'-GAACU-3', 5'-AGAACU-3', 5'-UAGAACU-3', 5'-UUAGAACU-3', 5'-AUUAGAACU-3', 5'-GAUUAGAACU-3'(서열번호 54), 5'-GGAUUAGAACU-3'(서열번호 55), 5'-GGGAUUAGAACU-3'(서열번호 56), 5'-GGGAUUAGAACUU-3'(서열번호 442), 및 5'-GGGAUUAGAACUUG-3'(서열번호 443)로 이루어진 군에서 선택된 제11 서열을 추가적으로 포함할 수 있다. 이때, 상기 제3 서열의 3'말단 및 상기 제4 서열의 5'말단은 상기 제11 서열을 통해 연결되어 있을 수 있다.

- [583] 상기 구현예의 또 다른 구체예로, 상기 엔지니어링 된 스캐폴드 영역의 서열은 5'-A-3', 5'-AA-3', 5'-AAA-3', 5'-AAAG-3', 5'-AAAGC-3', 5'-AAAGCU-3', 5'-AAAGCUG-3', 5'-AAAGCUGU-3', 5'-AAAGCUGUC-3', 5'-AAAGCUGUCC-3'(서열번호 52), 5'-AAAGCUGUCCC-3'(서열번호 53), 5'-AAAAGCUGUCCC-3'(서열번호 440), 및 5'-CAAAAGCUGUCCC-3'(서열번호 441)로 이루어진 군에서 선택된 제10 서열 및 5'-U-3', 5'-CU-3', 5'-ACU-3',

5'-AACU-3', 5'-GAACU-3', 5'-AGAACU-3', 5'-UAGAACU-3', 5'-UUAGAACU-3',
5'-AUUAGAACU-3', 5'-GAUUAGAACU-3'(서열번호 54),
5'-GGAUUAGAACU-3'(서열번호 55), 5'-GGGAUUAGAACU-3'(서열번호 56),
5'-GGGAUUAGAACUU-3'(서열번호 442), 및

5'-GGGAUUAGAACUUG-3'(서열번호 443)로 이루어진 군에서 선택된 제11
서열을 추가적으로 포함할 수 있다. 이때, 상기 제2 서열의 3'말단 및 상기 제3
서열의 5'말단은 상기 제10 서열을 통해 연결되어 있고, 상기 제3 서열의 3'말단
및 상기 제4 서열의 5'말단은 상기 제11 서열을 통해 연결되어 있을 수 있다.

- [584] 일 예로, 상기 제10 서열이 5'-A-3'인 경우, 상기 제11 서열은 5'-U-3'일 수 있다.
또 다른 예로, 상기 제10 서열이 5'-AA-3'인 경우, 상기 제11 서열은 5'-CU-3'일 수
있다. 또 다른 예로, 상기 제10 서열이 5'-AAA-3'인 경우, 상기 제11 서열은
5'-ACU-3'일 수 있다. 또 다른 예로, 상기 제10 서열이 5'-AAAG-3'인 경우, 상기
제11 서열은 5'-AACU-3'일 수 있다. 또 다른 예로, 상기 제10 서열이
5'-AAAGC-3'인 경우, 상기 제11 서열은 5'-GAACU-3'일 수 있다. 또 다른 예로,
상기 제10 서열이 5'-AAAGCU-3'인 경우, 상기 제11 서열은 5'-AGAACU-3'일 수
있다. 또 다른 예로, 상기 제10 서열이 5'-AAAGCUG-3'인 경우, 상기 제11 서열은
5'-UAGAACU-3' 또는 5'-UUAGAACU-3' 일 수 있다. 또 다른 예로, 상기 제10
서열이 5'-AAAGCUGU-3'인 경우, 상기 제11 서열은 5'-AUUAGAACU-3' 일 수
있다. 또 다른 예로, 상기 제10 서열이 5'-AAAGCUGUC-3'인 경우, 상기 제11
서열은 5'-GAUUAGAACU-3'(서열번호 54) 일 수 있다. 또 다른 예로, 상기 제10
서열이 5'-AAAGCUGUCC-3'(서열번호 52)인 경우, 상기 제11 서열은
5'-GGAUUAGAACU-3'(서열번호 55) 일 수 있다. 또 다른 예로, 상기 제10 서열이
5'-AAAGCUGUCCC-3'(서열번호 53)인 경우, 상기 제11 서열은
5'-GGGAUUAGAACU-3'(서열번호 56) 일 수 있다. 또 다른 예로, 상기 제10
서열이 5'-AAAAGCUGUCCC-3'(서열번호 440)인 경우, 상기 제11 서열은
5'-GGGAUUAGAACUU-3'(서열번호 442) 일 수 있다. 또 다른 예로, 상기 제10
서열이 5'-CAAAAGCUGUCCC-3'(서열번호 441)인 경우, 상기 제11 서열은
5'-GGGAUUAGAACUUG-3'(서열번호 443) 일 수 있다.

- [585] 상기 구현예의 또 다른 구체예로, 상기 엔지니어링 된 스캐폴드 영역의 서열은
5'-U-3', 5'-UU-3', 5'-UUC-3', 5'-UUCA-3', 5'-UUCAU-3', 5'-UUCAUU-3', 및
5'-UUCAUUU-3'로 이루어진 군에서 선택된 제 12서열을 추가적으로 포함할 수
있다. 이때, 상기 제6 서열의 3'말단 및 상기 링커의 5'말단은 상기 제12 서열을
통해 연결되어 있을 수 있다.

- [586] 상기 구현예의 또 다른 구체예로, 상기 엔지니어링 된 스캐폴드 영역의 서열은
5'-A-3', 5'-AA-3', 5'-GAA-3', 5'-UGAA-3', 5'-AUGAA-3', 5'-AAUGAA-3', 및
5'-GAAUGAA-3'로 이루어진 군에서 선택된 제 13서열을 추가적으로 포함할 수
있다. 이때, 상기 링커의 3'말단 및 상기 제7 서열의 5'말단은 상기 제13 서열을
통해 연결되어 있을 수 있다.

- [587] 상기 구현예의 또 다른 구체예로, 상기 엔지니어링 된 스캐폴드 영역의 서열은 5'-U-3', 5'-UU-3', 5'-UUC-3', 5'-UUCA-3', 5'-UUCAU-3', 5'-UUCAUU-3', 및 5'-UUCAUUU-3'로 이루어진 군에서 선택된 제 12서열, 및 5'-A-3', 5'-AA-3', 5'-GAA-3', 5'-UGAA-3', 5'-AUGAA-3', 5'-AAUGAA-3', 및 5'-GAAUGAA-3'로 이루어진 군에서 선택된 제 13서열을 추가적으로 포함할 수 있다. 이때, 상기 제6 서열의 3'말단 및 상기 링커의 5'말단은 상기 제12 서열을 통해 연결되고, 상기 링커의 3'말단 및 상기 제7 서열의 5'말단은 상기 제13 서열을 통해 연결되어 있을 수 있다.
- [588] 일 예로, 상기 제12 서열이 5'-U-3'인 경우, 상기 제13 서열은 5'-A-3'일 수 있다. 또 다른 예로, 상기 제12 서열이 5'-UU-3'인 경우, 상기 제13 서열은 5'-AA-3'일 수 있다. 또 다른 예로, 상기 제12 서열이 5'-UUC-3'인 경우, 상기 제13 서열은 5'-GAA-3'일 수 있다. 또 다른 예로, 상기 제12 서열이 5'-UUCA-3'인 경우, 상기 제13 서열은 5'-UGAA-3'일 수 있다. 또 다른 예로, 상기 제12 서열이 5'-UUCAU-3'인 경우, 상기 제13 서열은 5'-AUGAA-3'일 수 있다. 또 다른 예로, 상기 제12 서열이 5'-UUCAUU-3'인 경우, 상기 제13 서열은 5'-AAUGAA-3'일 수 있다. 또 다른 예로, 상기 제12 서열이 5'-UUCAUUU-3'인 경우, 상기 제13 서열은 5'-GAAUGAA-3'일 수 있다.
- [589] 엔지니어링 된 싱글 가이드 RNA 예시 5
- [590] 일 구현예로, 상기 엔지니어링 된 Cas12f1 가이드 RNA는 5'말단에서 3'말단 방향으로, 엔지니어링 된 스캐폴드 영역, 및 스페이서가 순서대로 연결된 것일 수 있다.
- [591] 상기 스페이서는 10 내지 50 뉴클레오타이드 길이를 가지며, 표적 서열과 상보적인 서열을 가진다. 예를 들어, 10 개, 11 개, 12 개, 13 개, 14 개, 15 개, 16 개, 17 개, 18 개, 19 개, 20 개, 21 개, 22 개, 23 개, 24 개, 25 개, 26 개, 27 개, 28 개, 29 개, 30 개, 31 개, 32 개, 33 개, 34 개, 35 개, 36 개, 37 개, 38 개, 39 개 또는 40 개의 뉴클레오타이드 길이를 가질 수 있다.
- [592] 상기 엔지니어링 된 스캐폴드 영역의 서열은 5'말단에서 3'말단 방향으로 다음 서열이 순서대로 연결된 것이다:
- [593] 5'-A-3'로 표현되는 제1 서열;
- [594] 5'-CCGCUUCAC-3'(서열번호 432)로 표현되는 제2 서열;
- [595] 5'-UUAG-3'로 표현되는 제3 서열;
- [596] 5'-UGAGUGAAGG-3'(서열번호 433)로 표현되는 제4 서열;
- [597] 5'-GCUGCUUGCAUCAGCCUAAUGUCGAGAAGUGCUUUCUUCGGAAAGU AACCCUCGA-3'(서열번호 11)로 표현되는 제5 서열;
- [598] 5'-AACAAA-3'로 표현되는 제6 서열;
- [599] 링커;
- [600] 5'-GGA-3'로 표현되는 제7 서열; 및
- [601] 5'-AUGCAAC-3'로 표현되는 제8 서열.

[602] 일 예로, 상기 링커는 5'-GAAA-3'일 수 있다.

[603] 또 다른 예로, 상기 링커는 5'-GAAA-3', 5'-AGAAAG-3', 5'-AAGAAAGU-3', 5'-CAAGAAAGUU-3'(서열번호 316), 5'-ACAAGAAAGUUG-3'(서열번호 317), 5'-CACAAGAAAGUUGC-3'(서열번호 318), 5'-GCACAAGAAAGUUGCA-3'(서열번호 319), 5'-UGCACAAGAAAGUUGCAG-3'(서열번호 320), 5'-CUGCACAAGAAAGUUGCAGA-3'(서열번호 321), 5'-UCUGCACAAGAAAGUUGCAGAA-3'(서열번호 322), 5'-UUCUGCACAAGAAAGUUGCAGAAC-3'(서열번호 323), 5'-AUUCUGCACAAGAAAGUUGCAGAACCC-3'(서열번호 324), 5'-AAUUCUGCACAAGAAAGUUGCAGAACCC-3'(서열번호 325), 5'-CAAUUCUGCACAAGAAAGUUGCAGAACCCG-3'(서열번호 326), 5'-CCAAUUCUGCACAAGAAAGUUGCAGAACCCGA-3'(서열번호 327), 5'-UCCAAUUCUGCACAAGAAAGUUGCAGAACCCGAA-3'(서열번호 328), 5'-CUCCAAUUCUGCACAAGAAAGUUGCAGAACCCGAAU-3'(서열번호 329), 5'-UCUCCAAUUCUGCACAAGAAAGUUGCAGAACCCGAAUA-3'(서열번호 330), 5'-CUCUCCAAUUCUGCACAAGAAAGUUGCAGAACCCGAAUAG-3'(서열번호 331), 5'-CCUCUCCAAUUCUGCACAAGAAAGUUGCAGAACCCGAAUAGA-3'(서열번호 332), 5'-UCCUCUCCAAUUCUGCACAAGAAAGUUGCAGAACCCGAAUAGAC-3'(서열번호 333), 5'-UCCUCUCCAAUUCUGCACAAGAAAGUUGCAGAACCCGAAUAGACG-3'(서열번호 334), 5'-UUUCCUCUCCAAUUCUGCACAAGAAAGUUGCAGAACCCGAAUAGACGA-3'(서열번호 335), 5'-UUUCCUCUCCAAUUCUGCACAAGAAAGUUGCAGAACCCGAAUAGACGAA-3'(서열번호 336), 5'-UUUUCCUCUCCAAUUCUGCACAAGAAAGUUGCAGAACCCGAAUAGACGAAU-3'(서열번호 337), 5'-AUUUUCCUCUCCAAUUCUGCACAAGAAAGUUGCAGAACCCGAAUAGACGAAUG-3'(서열번호 338), 5'-CAUUUUUCCUCUCCAAUUCUGCACAAGAAAGUUGCAGAACCCGAAUAGACGAAUGA-3'(서열번호 339), 5'-UCAUUUUUCCUCUCCAAUUCUGCACAAGAAAGUUGCAGAACCCGAAUAGACGAAUGAA-3'(서열번호 340), 5'-UCAUUUUUCCUCUCCAAUUCUGCACAAGAAAGUUGCAGAACCCGAAUAGACGAAUGAA-3'(서열번호 340),

GACGAAUGA-3'(서열번호 341), 및

5'-UUCAUUUUUCCUCUCCAAUUCUGCACAAGAAAGUUGCAGAACCCGAAU
AGACGAAUGAA-3'(서열번호 342)로 이루어진 군에서 선택된 것일 수 있다.

- [604] 상기 구현예의 일 구체예로, 상기 엔지니어링 된 스캐폴드 영역의 서열은
5'-A-3', 5'-GA-3', 5'-AGA-3', 5'-GAGA-3', 5'-GGAGA-3', 5'-UGGAGA-3',
5'-GUGGAGA-3', 5'-AGUGGAGA-3', 5'-AAGUGGAGA-3',
5'-AAAGUGGAGA-3'(서열번호 27), 5'-UAAAGUGGAGA-3'(서열번호 28),
5'-AUAAAGUGGAGA-3'(서열번호 29), 5'-GAUAAAGUGGAGA-3'(서열번호 30),
5'-UGAUAAAGUGGAGA-3'(서열번호 31),
5'-CUGAUAAAGUGGAGA-3'(서열번호 32),
5'-ACUGAUAAAGUGGAGA-3'(서열번호 33),
5'-CACUGAUAAAGUGGAGA-3'(서열번호 34),
5'-UCACUGAUAAAGUGGAGA-3'(서열번호 35),
5'-UUCACUGAUAAAGUGGAGA-3'(서열번호 36), 및
5'-CUUCACUGAUAAAGUGGAGA-3'(서열번호 37)로 이루어진 군에서 선택된
제9 서열을 추가적으로 포함할 수 있다. 이때, 상기 제9 서열의 3'말단은 상기 제1
서열의 5'말단과 연결되어 있을 수 있다.

- [605] 상기 구현예의 또 다른 구체예로, 상기 엔지니어링 된 스캐폴드 영역의 서열은
5'-A-3', 5'-AA-3', 5'-AAA-3', 5'-AAAG-3', 5'-AAAGC-3', 5'-AAAGCU-3',
5'-AAAGCUG-3', 5'-AAAGCUGU-3', 5'-AAAGCUGUC-3',
5'-AAAGCUGUCC-3'(서열번호 52), 5'-AAAGCUGUCCC-3'(서열번호 53),
5'-AAAAGCUGUCCC-3'(서열번호 440), 및 5'-CAAAAGCUGUCCC-3'(서열번호
441)로 이루어진 군에서 선택된 제10 서열을 추가적으로 포함할 수 있다. 이때,
상기 제2 서열의 3'말단 및 상기 제3 서열의 5'말단은 상기 제10 서열을 통해
연결되어 있을 수 있다.

- [606] 상기 구현예의 또 다른 구체예로, 상기 엔지니어링 된 스캐폴드 영역의 서열은
5'-U-3', 5'-CU-3', 5'-ACU-3', 5'-AACU-3', 5'-GAACU-3', 5'-AGAACU-3',
5'-UAGAACU-3', 5'-UUAGAACU-3', 5'-AUUAGAACU-3',
5'-GAUUAGAACU-3'(서열번호 54), 5'-GGAUUAGAACU-3'(서열번호 55),
5'-GGGAUUAGAACU-3'(서열번호 56), 5'-GGGAUUAGAACUU-3'(서열번호
442), 및 5'-GGGAUUAGAACUUG-3'(서열번호 443)로 이루어진 군에서 선택된
제11 서열을 추가적으로 포함할 수 있다. 이때, 상기 제3 서열의 3'말단 및 상기
제4 서열의 5'말단은 상기 제11 서열을 통해 연결되어 있을 수 있다.

- [607] 상기 구현예의 또 다른 구체예로, 상기 엔지니어링 된 스캐폴드 영역의 서열은
5'-A-3', 5'-AA-3', 5'-AAA-3', 5'-AAAG-3', 5'-AAAGC-3', 5'-AAAGCU-3',
5'-AAAGCUG-3', 5'-AAAGCUGU-3', 5'-AAAGCUGUC-3',
5'-AAAGCUGUCC-3'(서열번호 52), 5'-AAAGCUGUCCC-3'(서열번호 53),
5'-AAAAGCUGUCCC-3'(서열번호 440), 및 5'-CAAAAGCUGUCCC-3'(서열번호

441)로 이루어진 군에서 선택된 제10 서열 및 5'-U-3', 5'-CU-3', 5'-ACU-3', 5'-AACU-3', 5'-GAACU-3', 5'-AGAACU-3', 5'-UAGAACU-3', 5'-UUAGAACU-3', 5'-AUUAGAACU-3', 5'-GAUUAGAACU-3'(서열번호 54), 5'-GGAUUAGAACU-3'(서열번호 55), 5'-GGGAUUAGAACU-3'(서열번호 56), 5'-GGGAUUAGAACUU-3'(서열번호 442), 및 5'-GGGAUUAGAACUUG-3'(서열번호 443)로 이루어진 군에서 선택된 제11 서열을 추가적으로 포함할 수 있다. 이때, 상기 제2 서열의 3'말단 및 상기 제3 서열의 5'말단은 상기 제10 서열을 통해 연결되어 있고, 상기 제3 서열의 3'말단 및 상기 제4 서열의 5'말단은 상기 제11 서열을 통해 연결되어 있을 수 있다.

- [608] 일 예로, 상기 제10 서열이 5'-A-3'인 경우, 상기 제11 서열은 5'-U-3'일 수 있다. 또 다른 예로, 상기 제10 서열이 5'-AA-3'인 경우, 상기 제11 서열은 5'-CU-3'일 수 있다. 또 다른 예로, 상기 제10 서열이 5'-AAA-3'인 경우, 상기 제11 서열은 5'-ACU-3'일 수 있다. 또 다른 예로, 상기 제10 서열이 5'-AAAG-3'인 경우, 상기 제11 서열은 5'-AACU-3'일 수 있다. 또 다른 예로, 상기 제10 서열이 5'-AAAGC-3'인 경우, 상기 제11 서열은 5'-GAACU-3'일 수 있다. 또 다른 예로, 상기 제10 서열이 5'-AAAGCU-3'인 경우, 상기 제11 서열은 5'-AGAACU-3'일 수 있다. 또 다른 예로, 상기 제10 서열이 5'-AAAGCUG-3'인 경우, 상기 제11 서열은 5'-UAGAACU-3' 또는 5'-UUAGAACU-3' 일 수 있다. 또 다른 예로, 상기 제10 서열이 5'-AAAGCUGU-3'인 경우, 상기 제11 서열은 5'-AUUAGAACU-3' 일 수 있다. 또 다른 예로, 상기 제10 서열이 5'-AAAGCUGUC-3'인 경우, 상기 제11 서열은 5'-GAUUAGAACU-3'(서열번호 54) 일 수 있다. 또 다른 예로, 상기 제10 서열이 5'-AAAGCUGUCC-3'(서열번호 52)인 경우, 상기 제11 서열은 5'-GGAUUAGAACU-3'(서열번호 55) 일 수 있다. 또 다른 예로, 상기 제10 서열이 5'-AAAGCUGUCCC-3'(서열번호 53)인 경우, 상기 제11 서열은 5'-GGGAUUAGAACU-3'(서열번호 56) 일 수 있다. 또 다른 예로, 상기 제10 서열이 5'-AAAAGCUGUCCC-3'(서열번호 440)인 경우, 상기 제11 서열은 5'-GGGAUUAGAACUU-3'(서열번호 442) 일 수 있다. 또 다른 예로, 상기 제10 서열이 5'-CAAAAGCUGUCCC-3'(서열번호 441)인 경우, 상기 제11 서열은 5'-GGGAUUAGAACUUG-3'(서열번호 443) 일 수 있다.

- [609] 상기 구현예의 또 다른 구체예로, 상기 엔지니어링 된 스캐폴드 영역의 서열은 5'-U-3', 5'-UU-3', 5'-UUC-3', 5'-UUCA-3', 5'-UUCAU-3', 5'-UUCAUU-3', 5'-UUCAUUU-3', 5'-UUCAUUUU-3', 5'-UUCAUUUUU-3', 5'-UUCAUUUUUC-3'(서열번호 343), 5'-UUCAUUUUUCC-3'(서열번호 344), 5'-UUCAUUUUUCCU-3'(서열번호 345), 5'-UUCAUUUUUCCUC-3'(서열번호 346), 5'-UUCAUUUUUCCUCU-3'(서열번호 347), 5'-UUCAUUUUUCCUCUC-3'(서열번호 348), 5'-UUCAUUUUUCCUCUCC-3'(서열번호 349), 5'-UUCAUUUUUCCUCUCCA-3'(서열번호 350),

5'-UUCAUUUUUCCUCUCCAA-3'(서열번호 351),
 5'-UUCAUUUUUCCUCUCCAAU-3'(서열번호 352),
 5'-UUCAUUUUUCCUCUCCAAUU-3'(서열번호 353),
 5'-UUCAUUUUUCCUCUCCAAUUC-3'(서열번호 354),
 5'-UUCAUUUUUCCUCUCCAAUUCU-3'(서열번호 355),
 5'-UUCAUUUUUCCUCUCCAAUUCUG-3'(서열번호 356),
 5'-UUCAUUUUUCCUCUCCAAUUCUGC-3'(서열번호 357),
 5'-UUCAUUUUUCCUCUCCAAUUCUGCA-3'(서열번호 358),
 5'-UUCAUUUUUCCUCUCCAAUUCUGCAC-3'(서열번호 359),
 5'-UUCAUUUUUCCUCUCCAAUUCUGCACA-3'(서열번호 360), 및
 5'-UUCAUUUUUCCUCUCCAAUUCUGCACAA-3'(서열번호 361)로 이루어진
 군에서 선택된 제 12서열을 추가적으로 포함할 수 있다. 이때, 상기 제6 서열의
 3'말단 및 상기 링커의 5'말단은 상기 제12 서열을 통해 연결되어 있을 수 있다.

- [610] 상기 구현예의 또 다른 구체예로, 상기 엔지니어링 된 스캐폴드 영역의 서열은
 5'-A-3', 5'-AA-3', 5'-GAA-3', 5'-UGAA-3', 5'-AUGAA-3', 5'-AAUGAA-3',
 5'-GAAUGAA-3', 5'-CGAAUGAA-3', 5'-ACGAAUGAA-3',
 5'-GACGAAUGAA-3'(서열번호 362), 5'-AGACGAAUGAA-3'(서열번호 363),
 5'-UAGACGAAUGAA-3'(서열번호 364), 5'-AUAGACGAAUGAA-3'(서열번호
 365), 5'-AAUAGACGAAUGAA-3'(서열번호 366),
 5'-GAUAGACGAAUGAA-3'(서열번호 367),
 5'-CGAAUAGACGAAUGAA-3'(서열번호 368),
 5'-CCGAAUAGACGAAUGAA-3'(서열번호 369),
 5'-CCCGAAUAGACGAAUGAA-3'(서열번호 370),
 5'-ACCCGAAUAGACGAAUGAA-3'(서열번호 371),
 5'-AACCCGAAUAGACGAAUGAA-3'(서열번호 372),
 5'-GAACCCGAAUAGACGAAUGAA-3'(서열번호 373),
 5'-AGAACCCGAAUAGACGAAUGAA-3'(서열번호 374),
 5'-CAGAACCCGAAUAGACGAAUGAA-3'(서열번호 375),
 5'-GCAGAACCCGAAUAGACGAAUGAA-3'(서열번호 376),
 5'-UGCAGAACCCGAAUAGACGAAUGAA-3'(서열번호 377),
 5'-UUGCAGAACCCGAAUAGACGAAUGAA-3'(서열번호 378), 및
 5'-GUUGCAGAACCCGAAUAGACGAAUGAA-3'(서열번호 379)로 이루어진
 군에서 선택된 제 13서열을 추가적으로 포함할 수 있다. 이때, 상기 링커의 3'말단
 및 상기 제7 서열의 5'말단은 상기 제13 서열을 통해 연결되어 있을 수 있다.

- [611] 상기 구현예의 또 다른 구체예로, 상기 엔지니어링 된 스캐폴드 영역의 서열은
 5'-U-3', 5'-UU-3', 5'-UUC-3', 5'-UUCA-3', 5'-UUCAU-3', 5'-UUCAUU-3',
 5'-UUCAUUU-3', 5'-UUCAUUUU-3', 5'-UUCAUUUUU-3',
 5'-UUCAUUUUUC-3'(서열번호 343), 5'-UUCAUUUUUCC-3'(서열번호 344),

5'-UUCAUUUUUCCU-3'(서열번호 345), 5'-UUCAUUUUUCCUC-3'(서열번호 346), 5'-UUCAUUUUUCCUCU-3'(서열번호 347),
 5'-UUCAUUUUUCCUCUC-3'(서열번호 348),
 5'-UUCAUUUUUCCUCUCC-3'(서열번호 349),
 5'-UUCAUUUUUCCUCUCCA-3'(서열번호 350),
 5'-UUCAUUUUUCCUCUCCAA-3'(서열번호 351),
 5'-UUCAUUUUUCCUCUCCAAU-3'(서열번호 352),
 5'-UUCAUUUUUCCUCUCCAAUU-3'(서열번호 353),
 5'-UUCAUUUUUCCUCUCCAAUUC-3'(서열번호 354),
 5'-UUCAUUUUUCCUCUCCAAUUCU-3'(서열번호 355),
 5'-UUCAUUUUUCCUCUCCAAUUCUG-3'(서열번호 356),
 5'-UUCAUUUUUCCUCUCCAAUUCUGC-3'(서열번호 357),
 5'-UUCAUUUUUCCUCUCCAAUUCUGCA-3'(서열번호 358),
 5'-UUCAUUUUUCCUCUCCAAUUCUGCAC-3'(서열번호 359),
 5'-UUCAUUUUUCCUCUCCAAUUCUGCACA-3'(서열번호 360), 및
 5'-UUCAUUUUUCCUCUCCAAUUCUGCACAA-3'(서열번호 361)로 이루어진
 군에서 선택된 제 12서열, 및 5'-A-3', 5'-AA-3', 5'-GAA-3', 5'-UGAA-3',
 5'-AUGAA-3', 5'-AAUGAA-3', 5'-GAAUGAA-3', 5'-CGAAUGAA-3',
 5'-ACGAAUGAA-3', 5'-GACGAAUGAA-3'(서열번호 362),
 5'-AGACGAAUGAA-3'(서열번호 363), 5'-UAGACGAAUGAA-3'(서열번호 364),
 5'-AUAGACGAAUGAA-3'(서열번호 365), 5'-AAUAGACGAAUGAA-3'(서열번호 366), 5'-GAAUAGACGAAUGAA-3'(서열번호 367),
 5'-CGAAUAGACGAAUGAA-3'(서열번호 368),
 5'-CCGAAUAGACGAAUGAA-3'(서열번호 369),
 5'-CCCGAAUAGACGAAUGAA-3'(서열번호 370),
 5'-ACCCGAAUAGACGAAUGAA-3'(서열번호 371),
 5'-AACCCGAAUAGACGAAUGAA-3'(서열번호 372),
 5'-GAACCCGAAUAGACGAAUGAA-3'(서열번호 373),
 5'-AGAACCCGAAUAGACGAAUGAA-3'(서열번호 374),
 5'-CAGAACCCGAAUAGACGAAUGAA-3'(서열번호 375),
 5'-GCAGAACCCGAAUAGACGAAUGAA-3'(서열번호 376),
 5'-UGCAGAACCCGAAUAGACGAAUGAA-3'(서열번호 377),
 5'-UUGCAGAACCCGAAUAGACGAAUGAA-3'(서열번호 378), 및
 5'-GUUGCAGAACCCGAAUAGACGAAUGAA-3'(서열번호 379)로 이루어진
 군에서 선택된 제 13서열을 추가적으로 포함할 수 있다. 이때, 상기 제6 서열의
 3'말단 및 상기 링커의 5'말단은 상기 제12 서열을 통해 연결되고, 상기 링커의
 3'말단 및 상기 제7 서열의 5'말단은 상기 제13 서열을 통해 연결되어 있을 수
 있다.

[612] 일 예로, 상기 제12 서열이 5'-U-3'인 경우, 상기 제13 서열은 5'-A-3'일 수 있다. 또 다른 예로, 상기 제12 서열이 5'-UU-3'인 경우, 상기 제13 서열은 5'-AA-3'일 수 있다. 또 다른 예로, 상기 제12 서열이 5'-UUC-3'인 경우, 상기 제13 서열은 5'-GAA-3'일 수 있다. 또 다른 예로, 상기 제12 서열이 5'-UUCA-3'인 경우, 상기 제13 서열은 5'-UGAA-3'일 수 있다. 또 다른 예로, 상기 제12 서열이 5'-UUCAU-3'인 경우, 상기 제13 서열은 5'-AUGAA-3'일 수 있다. 또 다른 예로, 상기 제12 서열이 5'-UUCAUU-3'인 경우, 상기 제13 서열은 5'-AAUGAA-3'일 수 있다. 또 다른 예로, 상기 제12 서열이 5'-UUCAUUU-3'인 경우, 상기 제13 서열은 5'-GAAUGAA-3'일 수 있다. 또 다른 예로, 상기 제12 서열이 5'-UUCAUUUU-3'인 경우, 상기 제13 서열은 5'-CGAUGAA-3'일 수 있다. 또 다른 예로, 상기 제12 서열이 5'-UUCAUUUUU-3'인 경우, 상기 제13 서열은 5'-ACGAUGAA-3'일 수 있다. 또 다른 예로, 상기 제12 서열이 5'-UUCAUUUUUC-3'인 경우, 상기 제13 서열은 5'-GACGAUGAA-3'일 수 있다. 또 다른 예로, 상기 제12 서열이 5'-UUCAUUUUUCC-3'인 경우, 상기 제13 서열은 5'-AGACGAUGAA-3'일 수 있다. 또 다른 예로, 상기 제12 서열이 5'-UUCAUUUUUCCU-3'인 경우, 상기 제13 서열은 5'-UAGACGAUGAA-3'일 수 있다. 또 다른 예로, 상기 제12 서열이 5'-UUCAUUUUUCCUC-3'인 경우, 상기 제13 서열은 5'-AUAGACGAUGAA-3'일 수 있다. 또 다른 예로, 상기 제12 서열이 5'-UUCAUUUUUCCUCU-3'인 경우, 상기 제13 서열은 5'-AAUAGACGAUGAA-3'일 수 있다. 또 다른 예로, 상기 제12 서열이 5'-UUCAUUUUUCCUCUC-3'인 경우, 상기 제13 서열은 5'-GAUAGACGAUGAA-3'일 수 있다. 또 다른 예로, 상기 제12 서열이 5'-UUCAUUUUUCCUCUCC-3'인 경우, 상기 제13 서열은 5'-CGAAUAGACGAUGAA-3'일 수 있다. 또 다른 예로, 상기 제12 서열이 5'-UUCAUUUUUCCUCUCCA-3'인 경우, 상기 제13 서열은 5'-CCGAAUAGACGAUGAA-3'일 수 있다. 또 다른 예로, 상기 제12 서열이 5'-UUCAUUUUUCCUCUCCAA-3'인 경우, 상기 제13 서열은 5'-CCCGAAUAGACGAUGAA-3'일 수 있다. 또 다른 예로, 상기 제12 서열이 5'-UUCAUUUUUCCUCUCCAAU-3'인 경우, 상기 제13 서열은 5'-ACCCGAAUAGACGAUGAA-3'일 수 있다. 또 다른 예로, 상기 제12 서열이 5'-UUCAUUUUUCCUCUCCAAUU-3'인 경우, 상기 제13 서열은 5'-AACCCGAAUAGACGAUGAA-3'일 수 있다. 또 다른 예로, 상기 제12 서열이 5'-UUCAUUUUUCCUCUCCAAUUC-3'인 경우, 상기 제13 서열은 5'-GAACCCGAAUAGACGAUGAA-3'일 수 있다. 또 다른 예로, 상기 제12 서열이 5'-UUCAUUUUUCCUCUCCAAUUCU-3'인 경우, 상기 제13 서열은 5'-AGAACCCGAAUAGACGAUGAA-3'일 수 있다. 또 다른 예로, 상기 제12 서열이 5'-UUCAUUUUUCCUCUCCAAUUCUG-3'인 경우, 상기 제13 서열은 5'-CAGAACCCGAAUAGACGAUGAA-3'일 수 있다. 또 다른 예로, 상기 제12

서열이 5'-UUCAUUUUUCCUCUCCAAUUCUGC-3'인 경우, 상기 제13 서열은 5'-GCAGAACCCGAAUAGACGAAUGAA-3'일 수 있다. 또 다른 예로, 상기 제12 서열이 5'-UUCAUUUUUCCUCUCCAAUUCUGCA-3'인 경우, 상기 제13 서열은 5'-UGCAGAACCCGAAUAGACGAAUGAA-3'일 수 있다. 또 다른 예로, 상기 제12 서열이 5'-UUCAUUUUUCCUCUCCAAUUCUGCAC-3'인 경우, 상기 제13 서열은 5'-UUGCAGAACCCGAAUAGACGAAUGAA-3'일 수 있다. 또 다른 예로, 상기 제12 서열이 5'-UUCAUUUUUCCUCUCCAAUUCUGCACA-3', 또는 5'-UUCAUUUUUCCUCUCCAAUUCUGCACAA-3'인 경우, 상기 제13 서열은 5'-GUUGCAGAACCCGAAUAGACGAAUGAA-3'일 수 있다.

[613] 엔지니어링 된 싱글 가이드 RNA 서열 예시

[614] 일 구현예로, 상기 엔지니어링 된 싱글 가이드 RNA는 서열번호 210 내지 258, 서열번호 381 내지 393, 서열번호 396 내지 서열번호 407, 서열번호 409 내지 서열번호 421, 및 서열번호 436 내지 서열번호 439로 이루어진 군에서 선택된 서열을 가질 수 있다.

[615] 엔지니어링 된 듀얼 가이드 RNA 예시 1

[616] 일 구현예로, 상기 엔지니어링 된 Cas12f1 가이드 RNA는 엔지니어링 된 스캐폴드 영역, 및 스페이서를 포함한다.

[617] 상기 스페이서는 10 내지 50 뉴클레오타이드 길이를 가지며, 표적 서열과 상보적인 서열을 가진다. 예를 들어, 10 개, 11 개, 12 개, 13 개, 14 개, 15 개, 16 개, 17 개, 18 개, 19 개, 20 개, 21 개, 22 개, 23 개, 24 개, 25 개, 26 개, 27 개, 28 개, 29 개, 30 개, 31 개, 32 개, 33 개, 34 개, 35 개, 36 개, 37 개, 38 개, 39 개 또는 40 개의 뉴클레오타이드 길이를 가질 수 있다.

[618] 상기 엔지니어링 된 스캐폴드 영역의 서열은 다음 서열을 포함한다:

[619] 5'말단에서 3'말단 방향으로,

[620] 5'-A-3', 5'-AA-3', 5'-GAA-3', 5'-AGAA-3', 5'-GAGAA-3', 5'-GGAGAA-3', 5'-UGGAGAA-3', 5'-GUGGAGAA-3', 5'-AGUGGAGAA-3', 5'-AAGUGGAGAA-3'(서열번호 16), 5'-AAAGUGGAGAA-3'(서열번호 17), 5'-UAAAGUGGAGAA-3'(서열번호 18), 5'-AUAAAGUGGAGAA-3'(서열번호 19), 5'-GAUAAAGUGGAGAA-3'(서열번호 20), 5'-UGAUAAAGUGGAGAA-3'(서열번호 21), 5'-CUGAUAAAGUGGAGAA-3'(서열번호 22), 5'-ACUGAUAAAGUGGAGAA-3'(서열번호 23), 5'-CACUGAUAAAGUGGAGAA-3'(서열번호 24), 5'-UCACUGAUAAAGUGGAGAA-3'(서열번호 25), 5'-UUCACUGAUAAAGUGGAGAA-3'(서열번호 26), 및 5'-CUUCACUGAUAAAGUGGAGAA-3'(서열번호 9)로 이루어진 군에서 선택된 서열,

[621] 5'-CCGCUUCACUUAGAGUGAAGGUGG-3'(서열번호 430),

- 5'-CCGCUUCACCUUAGGAGUGAAGGUGG-3'(서열번호 431),
 5'-CCGCUUCACCAUAGUGAGUGAAGGUGG-3'(서열번호 38),
 5'-CCGCUUCACCAAUAGUUGAGUGAAGGUGG-3'(서열번호 39),
 5'-CCGCUUCACCAAAUAGCUUGAGUGAAGGUGG-3'(서열번호 40),
 5'-CCGCUUCACCAAAAUAGACUUGAGUGAAGGUGG-3'(서열번호 41),
 5'-CCGCUUCACCAAAAAGUUAGAACUUGAGUGAAGGUGG-3'(서열번호 42),
 5'-CCGCUUCACCAAAAAGCUUAGGAACUUGAGUGAAGGUGG-3'(서열번호 43),
 5'-CCGCUUCACCAAAAAGCUUUAGAGAACUUGAGUGAAGGUGG-3'(서열번호 44),
 5'-CCGCUUCACCAAAAAGCUGUUAGUUAGAACUUGAGUGAAGGUGG-3'(서열번호 45),
 5'-CCGCUUCACCAAAAAGCUGUUAGUAGAACUUGAGUGAAGGUGG-3'(서열번호 46),
 5'-CCGCUUCACCAAAAAGCUGUUUAGAUUAGAACUUGAGUGAAGGUGG-3'(서열번호 47),
 5'-CCGCUUCACCAAAAAGCUGUCUUAGGAUUAGAACUUGAGUGAAGGUGG-3'(서열번호 48),
 5'-CCGCUUCACCAAAAAGCUGUCCUUAGGGAUUAGAACUUGAGUGAAGGUGG-3'(서열번호 49), 및
 5'-CCGCUUCACCAAAAAGCUGUCCCUUAGGGGAUUAGAACUUGAGUGAAGGUGG-3'(서열번호 10)로 이루어진 군에서 선택된 서열,
 [622] 5'-GCUGCUUGCAUCAGCCUAAUGUCGAGAAGUGCUUUCUUCGGAAAGUAACCCUCGA-3'(서열번호 11), 및
 [623] 5'-AACAAA-3', 5'-AACAAAU-3', 5'-AACAAAUU-3', 5'-AACAAAUUC-3', 5'-AACAAAUUCA-3'(서열번호 66), 5'-AACAAAUUCAU-3'(서열번호 67), 5'-AACAAAUUCAUU-3'(서열번호 68), 및 5'-AACAAAUUCAUUU-3'(서열번호 12)로 이루어진 군에서 선택된 서열이 연결된 엔지니어링 된 tracrRNA; 및
 [624] 5'-GGA-3', 5'-AGGA-3', 5'-AAGGA-3', 5'-GAAGGA-3', 5'-UGAAGGA-3', 5'-AUGAAGGA-3', 5'-AAUGAAGGA-3', 및 5'-GAAUGAAGGA-3'(서열번호 14)으로 이루어진 군에서 선택된 서열, 및
 [625] 5'-AUGCAAC-3'가 연결된 엔지니어링 된 crRNA 반복 서열 부분,
 [626] 이때, 상기 엔지니어링 된 crRNA 반복 서열 부분의 3'말단은 상기 스페이서의 5'말단과 연결 되어 있다.
 [627] 이때, 상기 엔지니어링 된 tracrRNA의 서열은
 5'-CUUCACUGAUAAAGUGGAGAACCGCUUCACCAAAAAGCUGUCCCUUAGGGAUUAGAACUUGAGUGAAGGUGGGCUGCUUGCAUCAGCCUAAUGUCGAAGUGCUUUCUUCGGAAAGUAACCCUCGAAACAAAUUCAUUU-3'(서열번호

호 1)과 상이하고, 및/또는 상기 엔지니어링 된 crRNA 반복 서열 부분은 5'-GAAUGAAGGAAUGCAAC-3'(서열번호 3)과 상이하다.

[628] 일 예로, 상기 엔지니어링 된 tracrRNA의 서열은 서열번호 1과 동일하고, 상기 엔지니어링 된 crRNA 반복 서열 부분은 서열번호 3과 상이할 수 있다. 또 다른 일 예로, 상기 엔지니어링 된 tracrRNA의 서열은 서열번호 1과 상이하고, 상기 엔지니어링 된 crRNA 반복 서열 부분은 서열번호 3과 동일할 수 있다. 또 다른 일 예로, 상기 엔지니어링 된 tracrRNA의 서열은 서열번호 1과 상이하고, 상기 엔지니어링 된 crRNA 반복 서열 부분은 서열번호 3과 상이할 수 있다.

[629] 일 예로, 상기 엔지니어링 된 tracrRNA가 5'-AACAAA-3'를 포함하는 경우, 상기 엔지니어링 된 crRNA는 5'-GGA-3'를 포함할 수 있다. 또 다른 예로, 상기 엔지니어링 된 tracrRNA가 5'-AACAAAU-3'를 포함하는 경우, 상기 엔지니어링 된 crRNA는 5'-AGGA-3'를 포함할 수 있다. 또 다른 예로, 상기 엔지니어링 된 tracrRNA가 5'-AACAAAUU-3'를 포함하는 경우, 상기 엔지니어링 된 crRNA는 5'-AAGGA-3'를 포함할 수 있다. 또 다른 예로, 상기 엔지니어링 된 tracrRNA가 5'-AACAAAUUC-3'를 포함하는 경우, 상기 엔지니어링 된 crRNA는 5'-GAAGGA-3'를 포함할 수 있다. 또 다른 예로, 상기 엔지니어링 된 tracrRNA가 5'-AACAAAUUCA-3'(서열번호 66)를 포함하는 경우, 상기 엔지니어링 된 crRNA는 5'-UGAAGGA-3'를 포함할 수 있다. 또 다른 예로, 상기 엔지니어링 된 tracrRNA가 5'-AACAAAUUCAU-3'(서열번호 67)를 포함하는 경우, 상기 엔지니어링 된 crRNA는 5'-AUGAAGGA-3'를 포함할 수 있다. 또 다른 예로, 상기 엔지니어링 된 tracrRNA가 5'-AACAAAUUCAUU-3'(서열번호 68)를 포함하는 경우, 상기 엔지니어링 된 crRNA는 5'-AAUGAAGGA-3'를 포함할 수 있다. 또 다른 예로, 상기 엔지니어링 된 tracrRNA가 5'-AACAAAUUCAUUU-3'(서열번호 12)를 포함하는 경우, 상기 엔지니어링 된 crRNA는 5'-GAAUGAAGGA-3'(서열번호 14)를 포함할 수 있다.

[630] 엔지니어링 된 듀얼 가이드 RNA 예시 2

[631] 일 구현예로, 상기 엔지니어링 된 Cas12f1 가이드 RNA는 엔지니어링 된 스캐폴드 영역, 및 스페이서를 포함한다.

[632] 상기 스페이서는 10 내지 50 뉴클레오타이드 길이를 가지며, 표적 서열과 상보적인 서열을 가진다. 예를 들어, 10 개, 11 개, 12 개, 13 개, 14 개, 15 개, 16 개, 17 개, 18 개, 19 개, 20 개, 21 개, 22 개, 23 개, 24 개, 25 개, 26 개, 27 개, 28 개, 29 개, 30 개, 31 개, 32 개, 33 개, 34 개, 35 개, 36 개, 37 개, 38 개, 39 개 또는 40 개의 뉴클레오타이드 길이를 가질 수 있다.

[633] 상기 엔지니어링 된 스캐폴드 영역의 서열은 다음 서열을 포함한다:

[634] 5'말단에서 3'말단 방향으로,

[635] 5'-A-3', 5'-AA-3', 5'-GAA-3', 5'-AGAA-3', 5'-GAGAA-3', 5'-GGAGAA-3', 5'-UGGAGAA-3', 5'-GUGGAGAA-3', 5'-AGUGGAGAA-3', 5'-AAGUGGAGAA-3'(서열번호 16), 5'-AAAGUGGAGAA-3'(서열번호 17),

5'-UAAAGUGGAGAA-3'(서열번호 18), 5'-AUAAAGUGGAGAA-3'(서열번호 19),
 5'-GAUAAAGUGGAGAA-3'(서열번호 20),
 5'-UGAUAAAGUGGAGAA-3'(서열번호 21),
 5'-CUGAUAAAGUGGAGAA-3'(서열번호 22),
 5'-ACUGAUAAAGUGGAGAA-3'(서열번호 23),
 5'-CACUGAUAAAGUGGAGAA-3'(서열번호 24),
 5'-UCACUGAUAAAGUGGAGAA-3'(서열번호 25),
 5'-UUCACUGAUAAAGUGGAGAA-3'(서열번호 26), 및
 5'-CUUCACUGAUAAAGUGGAGAA-3'(서열번호 9)로 이루어진 군에서 선택된
 서열,

- [636] 5'-CCGCUUCACUUAGAGUGAAGGUGG-3'(서열번호 430),
 5'-CCGCUUCACCUUAGGAGUGAAGGUGG-3'(서열번호 431),
 5'-CCGCUUCACCAUUAGUGAGUGAAGGUGG-3'(서열번호 38),
 5'-CCGCUUCACCAAUUAGUUGAGUGAAGGUGG-3'(서열번호 39),
 5'-CCGCUUCACCAAAUUAGCUUGAGUGAAGGUGG-3'(서열번호 40),
 5'-CCGCUUCACCAAAAUUAGACUUGAGUGAAGGUGG-3'(서열번호 41),
 5'-CCGCUUCACCAAAAAGUUAGAACUUGAGUGAAGGUGG-3'(서열번호 42),
 5'-CCGCUUCACCAAAAAGCUUAGGAACUUGAGUGAAGGUGG-3'(서열번호
 43),
 5'-CCGCUUCACCAAAAAGCUUUAGAGAACUUGAGUGAAGGUGG-3'(서열번호
 44),
 5'-CCGCUUCACCAAAAAGCUGUUAGUUAGAACUUGAGUGAAGGUGG-3'(서열
 번호 45),
 5'-CCGCUUCACCAAAAAGCUGUUAGUAGAACUUGAGUGAAGGUGG-3'(서열
 번호 46),
 5'-CCGCUUCACCAAAAAGCUGUUUAGAUUAGAACUUGAGUGAAGGUGG-3'(서열
 번호 47),
 5'-CCGCUUCACCAAAAAGCUGUCUUAGGAUUAGAACUUGAGUGAAGGUGG-
 3'(서열번호 48),
 5'-CCGCUUCACCAAAAAGCUGUCCUUAGGGAUUAGAACUUGAGUGAAGGU
 GG-3'(서열번호 49), 및
 5'-CCGCUUCACCAAAAAGCUGUCCCUUAGGGGAUUAGAACUUGAGUGAAG
 GUGG-3'(서열번호 10)로 이루어진 군에서 선택된 서열,
- [637] 5'-GCUGCUUGCAUCAGCCUAAUGUCGAGAAGUGCUUUCUUCGGAAAGU
 AACCCUCGA-3'(서열번호 11), 및
- [638] 5'-AACAAA-3', 5'-AACAAAU-3', 5'-AACAAAUU-3', 5'-AACAAAUUC-3',
 5'-AACAAAUUCA-3'(서열번호 66), 5'-AACAAAUUCAU-3'(서열번호 67),
 5'-AACAAAUUCAUU-3'(서열번호 68), 5'-AACAAAUUCAUUU-3'(서열번호 69),

5'-AACAAAUUCAUUUU-3'(서열번호 70),
 5'-AACAAAUUCAUUUU-3'(서열번호 71),
 5'-AACAAAUUCAUUUUUC-3'(서열번호 72),
 5'-AACAAAUUCAUUUUUC-3'(서열번호 73),
 5'-AACAAAUUCAUUUUUCU-3'(서열번호 74),
 5'-AACAAAUUCAUUUUUCUC-3'(서열번호 75),
 5'-AACAAAUUCAUUUUUCUCU-3'(서열번호 76),
 5'-AACAAAUUCAUUUUUCUCUC-3'(서열번호 77),
 5'-AACAAAUUCAUUUUUCUCUC-3'(서열번호 78),
 5'-AACAAAUUCAUUUUUCUCUCC-3'(서열번호 79),
 5'-AACAAAUUCAUUUUUCUCUCCA-3'(서열번호 80),
 5'-AACAAAUUCAUUUUUCUCUCCAAU-3'(서열번호 81),
 5'-AACAAAUUCAUUUUUCUCUCCAAU-3'(서열번호 82),
 5'-AACAAAUUCAUUUUUCUCUCCAAUUC-3'(서열번호 83),
 5'-AACAAAUUCAUUUUUCUCUCCAAUUCU-3'(서열번호 84),
 5'-AACAAAUUCAUUUUUCUCUCCAAUUCUG-3'(서열번호 85),
 5'-AACAAAUUCAUUUUUCUCUCCAAUUCUGC-3'(서열번호 86),
 5'-AACAAAUUCAUUUUUCUCUCCAAUUCUGCA-3'(서열번호 87),
 5'-AAACAAAUUCAUUUUUCUCUCCAAUUCUGCAC-3'(서열번호 88),
 5'-AACAAAUUCAUUUUUCUCUCCAAUUCUGCACA-3'(서열번호 89), 및
 5'-AACAAAUUCAUUUUUCUCUCCAAUUCUGCACAA-3'(서열번호 13)로
 이루어진 군에서 선택된 서열이 연결된 엔지니어링 된 *tracrRNA*; 및

- [639] 5'-GGA-3', 5'-AGGA-3', 5'-AAGGA-3', 5'-GAAGGA-3', 5'-UGAAGGA-3',
 5'-AUGAAGGA-3', 5'-AAUGAAGGA-3', 5'-GAAUGAAGGA-3'(서열번호 90),
 5'-CGAUGAAGGA-3'(서열번호 91), 5'-ACGAUGAAGGA-3'(서열번호 92),
 5'-GACGAUGAAGGA-3'(서열번호 93), 5'-AGACGAUGAAGGA-3'(서열번호 94), 5'-UAGACGAUGAAGGA-3'(서열번호 95),
 5'-AUAGACGAUGAAGGA-3'(서열번호 96),
 5'-AAUAGACGAUGAAGGA-3'(서열번호 97),
 5'-GAAUAGACGAUGAAGGA-3'(서열번호 98),
 5'-CGAAUAGACGAUGAAGGA-3'(서열번호 99),
 5'-CCGAAUAGACGAUGAAGGA-3'(서열번호 100),
 5'-CCCGAAUAGACGAUGAAGGA-3'(서열번호 101),
 5'-ACCCGAAUAGACGAUGAAGGA-3'(서열번호 102),
 5'-AACCCGAAUAGACGAUGAAGGA-3'(서열번호 103),
 5'-GAACCCGAAUAGACGAUGAAGGA-3'(서열번호 104),
 5'-AGAACCCGAAUAGACGAUGAAGGA-3'(서열번호 105),
 5'-CAGAACCCGAAUAGACGAUGAAGGA-3'(서열번호 106),

5'-GCAGAACCCGAAUAGACGAAUGAAGGA-3'(서열번호 107),
 5'-UGCAGAACCCGAAUAGACGAAUGAAGGA-3'(서열번호 108),
 5'-UUGCAGAACCCGAAUAGACGAAUGAAGGA-3'(서열번호 109), 및
 5'-GUUGCAGAACCCGAAUAGACGAAUGAAGGA-3'(서열번호 15)로 이루어진
 군에서 선택된 서열, 및

[640] 5'-AUGCAAC-3'가 연결된 엔지니어링 된 crRNA 반복 서열 부분,

[641] 이때, 상기 엔지니어링 된 crRNA 반복 서열 부분의 3'말단은 상기 스페이서의
 5'말단과 연결 되어 있다.

[642] 이때, 상기 엔지니어링 된 tracrRNA의 서열은

5'-CUUCACUGAUAAAGUGGAGAACCGCUUCACCAAAAGCUGUCCCUUAGG
 GGAUUAGAACUUGAGUGAAGGUGGGCUGCUUGCAUCAGCCUAAUGUCGA
 GAAGUGCUUUCUUCGGAAAGUAACCCUCGAAACAAAUUCAUUUUUCCUC
 UCCAAUUCUGCACAA-3'(서열번호 2)과 상이하고, 및/또는 상기 엔지니어링 된
 crRNA 반복 서열 부분은

5'-GUUGCAGAACCCGAAUAGACGAAUGAAGGAAUGCAAC-3'(서열번호 4)과
 상이하다.

[643] 일 예로, 상기 엔지니어링 된 tracrRNA의 서열은 서열번호 2과 동일하고, 상기
 엔지니어링 된 crRNA 반복 서열 부분은 서열번호 4과 상이할 수 있다. 또 다른 일
 예로, 상기 엔지니어링 된 tracrRNA의 서열은 서열번호 2과 상이하고, 상기
 엔지니어링 된 crRNA 반복 서열 부분은 서열번호 4과 동일할 수 있다. 또 다른 일
 예로, 상기 엔지니어링 된 tracrRNA의 서열은 서열번호 2과 상이하고, 상기
 엔지니어링 된 crRNA 반복 서열 부분은 서열번호 4과 상이할 수 있다.

[644] 일 예로, 상기 엔지니어링 된 tracrRNA가 5'-AACAAA-3'를 포함하는 경우, 상기
 엔지니어링 된 crRNA는 5'-GGA-3'를 포함할 수 있다. 또 다른 예로, 상기
 엔지니어링 된 tracrRNA가 5'-AACAAAU-3'를 포함하는 경우, 상기 엔지니어링
 된 crRNA는 5'-AGGA-3'를 포함할 수 있다. 또 다른 예로, 상기 엔지니어링 된
 tracrRNA가 5'-AACAAAUU-3'를 포함하는 경우, 상기 엔지니어링 된 crRNA는
 5'-AAGGA-3'를 포함할 수 있다. 또 다른 예로, 상기 엔지니어링 된 tracrRNA가
 5'-AACAAAUUC-3'를 포함하는 경우, 상기 엔지니어링 된 crRNA는
 5'-GAAGGA-3'를 포함할 수 있다. 또 다른 예로, 상기 엔지니어링 된 tracrRNA가
 5'-AACAAAUUCA-3'(서열번호 66)를 포함하는 경우, 상기 엔지니어링 된
 crRNA는 5'-UGAAGGA-3'를 포함할 수 있다. 또 다른 예로, 상기 엔지니어링 된
 tracrRNA가 5'-AACAAAUUCAU-3'(서열번호 67)를 포함하는 경우, 상기
 엔지니어링 된 crRNA는 5'-AUGAAGGA-3'를 포함할 수 있다. 또 다른 예로, 상기
 엔지니어링 된 tracrRNA가 5'-AACAAAUUCAUU-3'(서열번호 68)를 포함하는
 경우, 상기 엔지니어링 된 crRNA는 5'-AAUGAAGGA-3'를 포함할 수 있다. 또
 다른 예로, 상기 엔지니어링 된 tracrRNA가 5'-AACAAAUUCAUUU-3'(서열번호
 69)를 포함하는 경우, 상기 엔지니어링 된 crRNA는

5'-GAAUGAAGGA-3'(서열번호 90)를 포함할 수 있다. 또 다른 예로, 상기 엔지니어링 된 tracrRNA가 5'-AACAAAUUCAUUUU-3'(서열번호 70)를 포함하는 경우, 상기 엔지니어링 된 crRNA는 5'-CGAAUGAAGGA-3'(서열번호 91)를 포함할 수 있다. 또 다른 예로, 상기 엔지니어링 된 tracrRNA가 5'-AACAAAUUCAUUUUU-3'(서열번호 71)를 포함하는 경우, 상기 엔지니어링 된 crRNA는 5'-ACGAAUGAAGGA-3'(서열번호 92)를 포함할 수 있다. 또 다른 예로, 상기 엔지니어링 된 tracrRNA가 5'-AACAAAUUCAUUUUUC-3'(서열번호 72)를 포함하는 경우, 상기 엔지니어링 된 crRNA는 5'-GACGAAUGAAGGA-3'(서열번호 93)를 포함할 수 있다. 또 다른 예로, 상기 엔지니어링 된 tracrRNA가 5'-AACAAAUUCAUUUUUCC-3'(서열번호 73)를 포함하는 경우, 상기 엔지니어링 된 crRNA는 5'-AGACGAAUGAAGGA-3'(서열번호 94)를 포함할 수 있다. 또 다른 예로, 상기 엔지니어링 된 tracrRNA가 5'-AACAAAUUCAUUUUUCCU-3'(서열번호 74)를 포함하는 경우, 상기 엔지니어링 된 crRNA는 5'-UAGACGAAUGAAGGA-3'(서열번호 95)를 포함할 수 있다. 또 다른 예로, 상기 엔지니어링 된 tracrRNA가 5'-AACAAAUUCAUUUUUCCUC-3'(서열번호 75)를 포함하는 경우, 상기 엔지니어링 된 crRNA는 5'-AUAGACGAAUGAAGGA-3'(서열번호 96)를 포함할 수 있다. 또 다른 예로, 상기 엔지니어링 된 tracrRNA가 5'-AACAAAUUCAUUUUUCCUCU-3'(서열번호 76)를 포함하는 경우, 상기 엔지니어링 된 crRNA는 5'-AAUAGACGAAUGAAGGA-3'(서열번호 97)를 포함할 수 있다. 또 다른 예로, 상기 엔지니어링 된 tracrRNA가 5'-AACAAAUUCAUUUUUCCUCUC-3'(서열번호 77)를 포함하는 경우, 상기 엔지니어링 된 crRNA는 5'-GAAUAGACGAAUGAAGGA-3'(서열번호 98)를 포함할 수 있다. 또 다른 예로, 상기 엔지니어링 된 tracrRNA가 5'-AACAAAUUCAUUUUUCCUCUCC-3'(서열번호 78)를 포함하는 경우, 상기 엔지니어링 된 crRNA는 5'-CGAAUAGACGAAUGAAGGA-3'(서열번호 99)를 포함할 수 있다. 또 다른 예로, 상기 엔지니어링 된 tracrRNA가 5'-AACAAAUUCAUUUUUCCUCUCCA-3'(서열번호 79)를 포함하는 경우, 상기 엔지니어링 된 crRNA는 5'-CCGAAUAGACGAAUGAAGGA-3'(서열번호 100)를 포함할 수 있다. 또 다른 예로, 상기 엔지니어링 된 tracrRNA가 5'-AACAAAUUCAUUUUUCCUCUCCAA-3'(서열번호 80)를 포함하는 경우, 상기 엔지니어링 된 crRNA는 5'-CCCGAAUAGACGAAUGAAGGA-3'(서열번호 101)를 포함할 수 있다. 또 다른 예로, 상기 엔지니어링 된 tracrRNA가 5'-AACAAAUUCAUUUUUCCUCUCCAAU-3'(서열번호 81)를 포함하는 경우, 상기 엔지니어링 된 crRNA는 5'-ACCCGAAUAGACGAAUGAAGGA-3'(서열번호 102)를 포함할 수 있다. 또 다른 예로, 상기 엔지니어링 된 tracrRNA가 5'-AACAAAUUCAUUUUUCCUCUCCAAUU-3'(서열번호 82)를 포함하는 경우,

상기 엔지니어링 된 crRNA는

5'-AACCCCGAAUAGACGAAUGAAGGA-3'(서열번호 103)를 포함할 수 있다. 또 다른 예로, 상기 엔지니어링 된 tracrRNA가

5'-AACAAAUUCAUUUUUCCUCUCCAAUUC-3'(서열번호 83)를 포함하는 경우, 상기 엔지니어링 된 crRNA는

5'-GAACCCCGAAUAGACGAAUGAAGGA-3'(서열번호 104)를 포함할 수 있다. 또 다른 예로, 상기 엔지니어링 된 tracrRNA가

5'-AACAAAUUCAUUUUUCCUCUCCAAUUCU-3'(서열번호 84)를 포함하는 경우, 상기 엔지니어링 된 crRNA는

5'-AGAACCCCGAAUAGACGAAUGAAGGA-3'(서열번호 105)를 포함할 수 있다. 또 다른 예로, 상기 엔지니어링 된 tracrRNA가

5'-AACAAAUUCAUUUUUCCUCUCCAAUUCUG-3'(서열번호 85)를 포함하는 경우, 상기 엔지니어링 된 crRNA는

5'-CAGAACCCCGAAUAGACGAAUGAAGGA-3'(서열번호 106)를 포함할 수 있다. 또 다른 예로, 상기 엔지니어링 된 tracrRNA가

5'-AACAAAUUCAUUUUUCCUCUCCAAUUCUGC-3'(서열번호 86)를 포함하는 경우, 상기 엔지니어링 된 crRNA는

5'-GCAGAACCCCGAAUAGACGAAUGAAGGA-3'(서열번호 107)를 포함할 수 있다. 또 다른 예로, 상기 엔지니어링 된 tracrRNA가

5'-AACAAAUUCAUUUUUCCUCUCCAAUUCUGCA-3'(서열번호 87)를 포함하는 경우, 상기 엔지니어링 된 crRNA는

5'-UGCAGAACCCCGAAUAGACGAAUGAAGGA-3'(서열번호 108)를 포함할 수 있다. 또 다른 예로, 상기 엔지니어링 된 tracrRNA가

5'-AAACAAAUUCAUUUUUCCUCUCCAAUUCUGCAC-3'(서열번호 88)를 포함하는 경우, 상기 엔지니어링 된 crRNA는

5'-UUGCAGAACCCCGAAUAGACGAAUGAAGGA-3'(서열번호 109)를 포함할 수 있다. 또 다른 예로, 상기 엔지니어링 된 tracrRNA가

5'-AACAAAUUCAUUUUUCCUCUCCAAUUCUGCACA-3'(서열번호 89) 또는 5'-AACAAAUUCAUUUUUCCUCUCCAAUUCUGCACAA-3'(서열번호 13)를

포함하는 경우, 상기 엔지니어링 된 crRNA는

5'-GUUGCAGAACCCCGAAUAGACGAAUGAAGGA-3'(서열번호 15)를 포함할 수 있다.

[645]

[646] 엔지니어링 된 CRISPR/Cas12f1 복합체

[647] CRISPR/Cas12f1 복합체 개관

[648] 본 명세서에서는 엔지니어링 된 CRISPR/Cas12f1 복합체를 제공한다. 상기 엔지니어링 된 CRISPR/Cas12f1 복합체는 Cas12f1 단백질 및 엔지니어링 된 Cas12f1 가이드 RNA를 포함한다. 이때, 상기 엔지니어링 된 Cas12f1 가이드

RNA는 "엔지니어링 된 Cas12f1 가이드 RNA" 단락에서 설명된 것이다.

- [649] 일 구현예로, 본 명세서에서는 Cas12f1 단백질 및 엔지니어링 된 Cas12f1 가이드 RNA를 포함하는, 표적 서열을 포함하는 핵산을 편집할 수 있는 엔지니어링 된 CRISPR/Cas12f1 복합체를 제공한다. 이때, 상기 엔지니어링 된 Cas12f1 가이드 RNA는 "엔지니어링 된 Cas12f1 가이드 RNA" 단락에서 설명된 것 중 어느 하나일 수 있다.

[650] Cas12f1 단백질 - 개괄

- [651] 본 명세서에서 제공하는 엔지니어링 된 CRISPR/Cas12f1 복합체는 Cas12f1 단백질이 포함된다. 기본적으로, 상기 Cas12f1 단백질은 자연계에 존재하는 야생형 Cas12f1 단백질일 수 있다. 상기 Cas12f1 단백질을 암호화하는 서열은 야생형 Cas12f1 단백질에 대해 인간 코돈-최적화된 Cas12f1 서열일 수 있다. 또한, 상기 Cas12f1 단백질은 자연계에 존재하는 야생형 Cas12f1 단백질과 동일한 기능을 가질 수 있다. 하지만, 특별히 한정하지 않는 한, 본 명세서에서 "Cas12f1 단백질"이라고 할 때, 이는 야생형, 또는 코돈 최적화된 Cas12f1 단백질 뿐 아니라, 변형된 Cas12f1 단백질 내지 Cas12f1 융합 단백질도 포괄하여 의미할 수 있다. 또한, 자연계에 존재하는 야생형 Cas12f1 단백질과 동일한 기능을 가지는 것 뿐 아니라, 상기 기능의 전부 또는 일부가 변형된 것, 상기 기능의 전부 또는 일부가 상실된 것, 및/또는 추가적인 기능이 부가된 것을 통틀어 일컬을 수 있다. Cas12f1 단백질의 의미는 문맥에 따라 적절히 해석될 수 있고, 특별한 경우가 아닌 한 가장 넓은 의미로 해석된다. 이하 Cas12f1 단백질의 구성, 또는 기능에 대해 자세히 설명한다.

[652] Cas12f1 단백질 - 야생형 Cas12f1 단백질

- [653] 본 명세서에서 제공하는 엔지니어링 된 CRISPR/Cas12f1 복합체는 Cas12f1 단백질을 포함할 수 있다.

- [654] 일 구현예로, 상기 Cas12f1 단백질은 야생형의 Cas12f1 단백질일 수 있다. 일 구현예로, 상기 Cas12f1 단백질은 Cas14 패밀리(Harrington et al., Programmed DNA destruction by miniature CRISPR-Cas14 enzymes, Science 362, 839-842 (2018))에서 유래한 것일 수 있다. 일 구현예로, 상기 Cas12f1 단백질은 Uncultured archaeon 유래의 Cas14a 단백질(Harrington et al., Programmed DNA destruction by miniature CRISPR-Cas14 enzymes, Science 362, 839-842 (2018))일 수 있다. 일 구현예로, 상기 Cas12f1 단백질은 Cas14a1 단백질일 수 있다.

[655] Cas12f1 단백질 - 변형된 Cas12f1 단백질

- [656] 본 명세서에서 제공하는 엔지니어링 된 CRISPR/Cas12f1 복합체는 변형된 Cas12f1 단백질을 포함할 수 있다. 상기 변형된 Cas12f1은 야생형, 또는 코돈 최적화된 Cas12f1 단백질 서열에서 적어도 일부 서열이 변형된 것을 의미한다. 상기 Cas12f1 단백질 변형은 개별 아미노산 단위로 이루어진 것일 수 있고, 단백질의 기능적 도메인 단위로 이루어진 것일 수 있다.

- [657] 일 구현예로, 상기 단백질의 변형은 야생형, 또는 코돈 최적화된 Cas12f1

단백질 서열에서 하나 이상의 아미노산, 펩타이드, 폴리펩타이드, 단백질, 및/또는 도메인이 개별적으로 치환, 제거, 및/또는 부가된 것일 수 있다. 일 구현예로, 상기 Cas12f1 단백질은 야생형 Cas12f1 단백질에 포함된 RuvC 도메인 내 하나 이상의 아미노산, 펩타이드, 및/또는 폴리펩타이드가 치환, 제거, 및/또는 부가된 것일 수 있다.

[658] Cas12f1 단백질 - Cas12f1 융합 단백질

[659] 본 명세서에서 제공하는 엔지니어링 된 CRISPR/Cas12f1 복합체는 Cas12f1 융합 단백질을 포함할 수 있다. 이때, 상기 Cas12f1 융합 단백질은 야생형, 또는 변형된 Cas12f1 단백질에 추가적인 아미노산, 펩타이드, 폴리펩타이드, 단백질, 및/또는 도메인이 융합된 단백질을 의미한다.

[660] 일 구현예로, Cas12f1 단백질은 야생형의 Cas12f1 단백질에 베이스 에디터, 및/또는 역전사 효소(reverse transcriptase)가 융합된 것일 수 있다. 일 구현예로, 상기 베이스 에디터는 adenosine deaminase, 및/또는 cytidine deaminase일 수 있다. 일 구현예로, 상기 역전사 효소는 Moloney Murine Leukemia Virus(M-MLV) 역전사 효소, 및/또는 그 변이체일 수 있다. 이때, 상기 역전사 효소가 융합된 Cas12f1 단백질은 프라임 에디터로 기능할 수 있다.

[661] 일 구현예로, Cas12f1 단백질은 야생형의 Cas12f1 단백질에, 세포 내의 유전자 발현 과정에 관여할 수 있는 다양한 효소가 융합된 것일 수 있다. 이때, 상기 효소가 융합된 Cas12f1 단백질은 세포 내 유전자 발현에 다양한 양적, 질적 변화를 초래할 수 있다. 일 구현예로, 상기 효소는 VP64, DNMT, TET, KRAB, DHAC, LSD, 및/또는 p300일 수 있다.

[662] Cas12f1 단백질 - 기능의 변경

[663] 본 명세서에서 제공하는 엔지니어링 된 CRISPR/Cas12f1 복합체에 포함된 Cas12f1 단백질은 야생형의 Cas12f1 단백질과 동일한 기능을 가질 수 있다. 본 명세서에서 제공하는 엔지니어링 된 CRISPR/Cas12f1 복합체에 포함된 Cas12f1 단백질은 야생형의 Cas12f1 단백질과 비교할 때, 기능이 변경된 것일 수 있다. 구체적으로, 상기 변경은 전부 또는 일부 기능의 변형, 전부 또는 일부 기능의 상실, 및/또는 부가적인 기능의 추가일 수 있다. 일 구현예로, 상기 Cas12f1 단백질은 당업계 통상의 기술자가 CRISPR/Cas 시스템의 Cas 단백질에 적용할 수 있는 변경이라면, 특별히 제한되지 않는다. 이때 상기 변경은 공지 기술을 이용한 것일 수 있다.

[664] 일 구현예로, 상기 Cas12f1 단백질은 표적 핵산의 이중가닥 중 하나의 가닥만 절단하도록 변경된 것일 수 있다. 더 나아가, 상기 Cas12f1 단백질은 표적 핵산의 이중가닥 중 하나의 가닥만 절단할 수 있고, 절단하지 않는 가닥에 대해 베이스 에디팅(Base editing) 또는 프라임 에디팅(Prime editing)을 할 수 있도록 변경된 것일 수 있다. 일 구현예로, 상기 Cas12f1 단백질은 표적 핵산의 이중가닥 전부를 절단할 수 없도록 변경된 것일 수 있다. 더 나아가, 상기 Cas12f1 단백질은 표적 핵산의 이중가닥 전부를 절단할 수 없고, 표적 핵산에 대해 베이스 에디팅(Base

editing), 프라임 에디팅(Prime editing), 또는 유전자 발현 조절 기능을 할 수 있도록 변경된 것일 수 있다.

[665] Cas12f1 단백질 - 기타 변형 예시

[666] 일 구현예로, 상기 Cas12f1 단백질은 NLS(Nuclear Localization Sequence), 또는 NES(Nuclear Export Sequence)를 포함할 수 있다. 구체적으로, 상기 NLS는 "용어의 정의" 중 NLS 단락에 예시된 것 중 어느 하나일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다. 일 구현예로, 상기 Cas12f1 단백질은 태그를 포함할 수 있다. 구체적으로, 상기 태그는 "용어의 정의" 중 태그 단락에 예시된 것 중 어느 하나일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

[667] Cas12f1 단백질 - PAM 서열

[668] CRISPR/Cas12f1 복합체가 표적 유전자, 또는 표적 핵산을 절단하기 위해서는 두 가지 조건이 필요하다.

[669] 첫째, 표적 유전자, 또는 표적 핵산 내에 Cas12f1 단백질이 인식할 수 있는 일정 길이의 염기 서열(뉴클레오타이드 서열)이 있어야 한다. 이때, 상기 Cas12f1 단백질에 의해 인식되는 일정 길이의 염기 서열(뉴클레오타이드 서열)을 Protospacer Adjacent Motif(PAM) 서열이라 한다. 상기 PAM 서열은 상기 Cas12f1 단백질에 따라 정해지는 고유한 서열이다. 둘째, 상기 일정 길이의 PAM 서열 주변에 가이드 RNA에 포함된 스페이서 서열과 상보적으로 결합할 수 있는 서열이 있어야 한다.

[670] 이러한 두 가지 조건이 만족되어 1) Cas12f1 단백질이 상기 일정 길이의 PAM 서열을 인식하고, 2) 상기 스페이서 서열 부분이 상기 PAM 서열 주변 서열 부분과 상보적으로 결합하는 경우, Cas12f1 단백질/가이드 RNA 복합체(CRISPR/Cas12f1 복합체)는 표적 유전자, 또는 표적 핵산을 절단한다. 따라서, 상기 CRISPR/Cas12f1 복합체의 표적 서열을 결정할 때, 상기 PAM 서열과 인접한 서열 내에서 상기 표적 서열을 결정해야 한다는 제약이 따른다.

[671] Cas12f1 단백질 - PAM 서열 예시

[672] 일 구현예로, 상기 Cas12f1 단백질의 PAM 서열은 T-rich 서열일 수 있다. 일 구현예로, 상기 Cas12f1 단백질의 PAM 서열은 5'말단에서 3'말단 순서로, THTN일 수 있다. 이때, 상기 N은 디옥시티미딘(T), 디옥시아데노신(A), 디옥시사이티딘(C), 또는 디옥시구아노신(G) 중 하나이며, 상기 H는 디옥시티미딘(T), 디옥시아데노신(A), 및 디옥시사이티딘(C) 중 하나이다. 일 구현예로, 상기 Cas12f1 단백질의 PAM 서열은 5'말단에서 3'말단 순서로, TTTN일 수 있다. 이때, 상기 N은 디옥시티미딘(T), 디옥시아데노신(A), 디옥시사이티딘(C), 또는 디옥시구아노신(G) 중 하나이다. 일 구현예로, 상기 Cas12f1 단백질의 PAM 서열은 5'말단에서 3'말단 순서로, TTTA, TTTT, TTTC, 또는 TTTC일 수 있다. 일 구현예로, 상기 Cas12f1 단백질의 PAM 서열은 5'말단에서 3'말단 순서로, TATA, TATT, TATC, 또는 TATG일 수 있다. 일 구현예로, 상기 Cas12f1 단백질의 PAM 서열은 5'말단에서 3'말단 순서로, TCTA,

TCTT, TCTC, 또는 TCTG일 수 있다. 일 구현예로, 상기 Cas12f1 단백질의 PAM 서열은 5' 말단에서 3' 말단 순서로, TTTA 또는 TTTG일 수 있다. 일 구현예로, 상기 Cas12f1 단백질의 PAM 서열은 야생형 Cas12f1 단백질의 PAM 서열과는 다른 것일 수 있다.

[673] Cas12f1 단백질 - 서열 예시

[674] 일 구현예로, 상기 Cas12f1 단백질은 서열번호 259 내지 서열번호 266로 이루어진 군에서 선택된 아미노산 서열을 가질 수 있다.

[675] 일 구현예로, 상기 Cas12f1 단백질을 암호화하는 DNA 서열은 인간 코돈-최적화된 서열일 수 있다.

[676] 일 구현예로, 상기 Cas12f1 단백질을 암호화하는 DNA 서열은 서열번호 267 내지 서열번호 276으로 이루어진 군에서 선택된 DNA 서열일 수 있다.

[677] 엔지니어링 된 Cas12f1 가이드 RNA

[678] 본 명세서에서 제공되는 CRISPR/Cas12f1 복합체를 구성하는 엔지니어링 된 Cas12f1 가이드 RNA는 "엔지니어링 된 Cas12f1 가이드 RNA" 단락에서 설명된 것과 동일한 특징 및 구조를 가진다.

[679] CRISPR/Cas12f1 복합체 - 구성 예시

[680] 일 구현예로, 상기 Cas12f1 단백질은 서열번호 259 내지 서열번호 262에서 선택된 아미노산 서열을 가지고, 상기 엔지니어링 된 Cas12f1 가이드 RNA는 서열번호 210 내지 258, 서열번호 381 내지 393, 서열번호 396 내지 서열번호 407, 및 서열번호 409 내지 서열번호 421로 이루어진 군에서 선택된 서열을 가질 수 있다. 이 때, 상기 Cas12f1 단백질 및 상기 엔지니어링 된 Cas12f1 가이드 RNA가 결합하여 CRISPR/Cas12f1 복합체를 형성할 수 있다.

[681] 일 구현예로, 상기 Cas12f1 단백질은 서열번호 263 내지 서열번호 266으로 이루어진 군에서 선택된 아미노산 서열을 가지고, 상기 엔지니어링 된 Cas12f1 가이드 RNA는 서열번호 210 내지 258, 서열번호 381 내지 393, 서열번호 396 내지 서열번호 407, 및 서열번호 409 내지 서열번호 421로 이루어진 군에서 선택된 서열을 가질 수 있다. 이 때, 상기 Cas12f1 단백질 및 상기 엔지니어링 된 Cas12f1 가이드 RNA가 결합하여 이루어진 CRISPR/Cas12f1 복합체는 베이스 에디팅 기능을 가질 수 있다.

[682]

[683] CRISPR/Cas12f1 시스템의 각 구성요소를 발현시키기 위한 벡터

[684] 벡터 개관

[685] 본 명세서에서는 CRISPR/Cas12f1 시스템의 구성 요소를 발현시키기 위한 벡터를 제공한다. 상기 벡터는 Cas12f1 단백질, 및/또는 엔지니어링 된 Cas12f1 가이드 RNA를 발현시키도록 구성된다. 상기 벡터의 서열은 상기 CRISPR/Cas12f1 시스템의 구성요소 중 하나를 암호화하는 핵산 서열을 포함하거나, 둘 이상의 구성요소를 암호화하는 핵산 서열을 포함할 수 있다. 상기 벡터의 서열은 Cas12f1 단백질을 암호화하는 핵산 서열 및/또는 엔지니어링

된 Cas12f1 가이드 RNA를 암호화하는 핵산 서열을 포함한다. 상기 벡터의 서열은 하나 이상의 프로모터 서열을 포함한다. 상기 프로모터는 Cas12f1 단백질을 암호화하는 핵산 서열 및/또는 엔지니어링 된 Cas12f1 가이드 RNA를 암호화하는 핵산 서열과 작동적으로 연결되어, 세포 내에서 상기 핵산 서열의 전사가 촉진될 수 있도록 한다. 상기 Cas12f1 단백질은 "엔지니어링 된 CRISPR/Cas12f1 복합체" 단락에서 설명된 Cas12f1 단백질, 변형된 Cas12f1 단백질, 및/또는 Cas12f1 융합 단백질과 동일한 특징 및 구성을 가진다. 상기 엔지니어링 된 Cas12f1 가이드 RNA는 "엔지니어링 된 Cas12f1 가이드 RNA" 단락에서 설명된 엔지니어링 된 Cas12f1 가이드 RNA와 동일한 특징 및 구성을 가진다.

[686] 상기 벡터의 서열은 Cas12f1 단백질을 암호화하는 핵산 서열 및 엔지니어링 된 Cas12f1 가이드 RNA를 암호화하는 핵산 서열을 포함할 수 있다. 일 구현예로, 상기 벡터의 서열은 Cas12f1 단백질을 암호화하는 핵산 서열을 포함하는 제1 서열, 및 엔지니어링 된 Cas12f1 가이드 RNA를 암호화하는 핵산 서열을 포함하는 제2 서열을 포함할 수 있다. 상기 벡터의 서열은 Cas12f1 단백질을 암호화하는 핵산 서열을 세포 내에서 발현시키기 위한 프로모터 서열, 및 엔지니어링 된 Cas12f1 가이드 RNA를 암호화하는 핵산 서열을 세포 내에서 발현시키기 위한 프로모터 서열을 포함하고, 상기 프로모터들은 각 발현 대상과 작동적으로 연결(operably linked)되어 있다. 일 구현예로, 상기 벡터의 서열은 상기 제1 서열과 작동 가능하게 연결된 제1 프로모터 서열, 및 상기 제2 서열과 작동 가능하게 연결된 제2 프로모터 서열을 포함할 수 있다.

[687] 상기 벡터의 서열은 Cas12f1 단백질을 암호화하는 핵산 서열 및 둘 이상의 서로 다른 엔지니어링 된 Cas12f1 가이드 RNA를 암호화하는 핵산 서열을 포함할 수 있다. 일 구현예로, 상기 벡터의 서열은 Cas12f1 단백질을 암호화하는 핵산 서열을 포함하는 제1 서열, 제1 엔지니어링 된 Cas12f1 가이드 RNA를 암호화하는 핵산 서열을 포함하는 제2 서열, 제2 엔지니어링 된 Cas12f1 가이드 RNA를 암호화하는 핵산 서열을 포함하는 제3 서열을 포함할 수 있다. 더 나아가, 상기 벡터의 서열은 상기 제1 서열과 작동 가능하게 연결된 제1 프로모터 서열, 상기 제2 서열과 작동 가능하게 연결된 제2 프로모터 서열, 상기 제3 서열과 작동 가능하게 연결된 제3 프로모터 서열을 포함할 수 있다.

[688] 상기 벡터에서, 각 구성요소를 암호화하는 핵산 서열은 DNA 서열일 수 있다.

[689] 발현 대상 - Cas12f1 단백질

[690] 상기 벡터는 Cas12f1 단백질을 발현하도록 구성된 것일 수 있다. 이때, 상기 Cas12f1 단백질은 "엔지니어링 된 CRISPR/Cas12f1 복합체" 단락에서 설명된 것과 동일한 구성 및 특징을 가진다.

[691] 일 구현예로, 상기 벡터는 야생형의 Cas12f1 단백질을 발현하도록 구성된 것일 수 있다. 이때, 상기 야생형의 Cas12f1 단백질은 Cas14a1일 수 있다. 일 구현예로, 상기 벡터는 표적 핵산의 이중가닥 중 하나의 가닥만 절단하도록 변경된 Cas12f1

단백질을 발현하도록 구성된 것일 수 있다. 더 나아가, 상기 변경된 Cas12f1 단백질은 표적 핵산의 이중가닥 중 하나의 가닥만 절단할 수 있고, 절단하지 않는 가닥에 대해 베이스 에디팅(Base editing) 또는 프라임 에디팅(Prime editing)을 할 수 있도록 변경된 것일 수 있다. 일 구현예로, 상기 Cas12f1 단백질은 표적 핵산의 이중가닥 전부를 절단할 수 없도록 변경된 것일 수 있다. 더 나아가, 상기 Cas12f1 단백질은 표적 핵산의 이중가닥 전부를 절단할 수 없고, 표적 핵산에 대해 베이스 에디팅(Base editing), 프라임 에디팅(Prime editing), 또는 유전자 발현 조절 기능을 할 수 있도록 변경된 것일 수 있다.

[692] 발현 대상 - 엔지니어링 된 Cas12f1 가이드 RNA

[693] 상기 벡터는 엔지니어링 된 Cas12f1 가이드 RNA를 발현하도록 구성된 것일 수 있다. 상기 엔지니어링 된 Cas12f1 가이드 RNA는 "엔지니어링 된 Cas12f1 가이드 RNA" 단락에서 설명한 엔지니어링 된 Cas12f1 가이드 RNA와 동일한 특징 및 구성을 가진다. 상기 벡터는 둘 이상의 서로 다른 엔지니어링 된 Cas12f1 가이드 RNA를 발현하도록 구성된 것일 수 있다.

[694] 발현 대상 - 부가 구성 요소

[695] 상기 벡터는 전술한 발현 대상 외, NLS, 태그 단백질 등의 부가 구성 요소를 발현하도록 구성된 것일 수 있다. 일 구현예로, 상기 부가 구성 요소는 상기 Cas12f1, 변형된 Cas12f1, 및/또는 엔지니어링 된 Cas12f1 가이드 RNA와는 독립적으로 발현될 수 있다. 또 다른 구현예로, 상기 부가 구성 요소는 상기 Cas12f1, 변형된 Cas12f1, 및/또는 엔지니어링 된 Cas12f1 가이드 RNA와 연결되어 발현될 수 있다. 이때, 상기 부가 구성 요소는 CRISPR/Cas 시스템을 발현시키고자 할 때 일반적으로 발현시키는 구성 요소일 수 있으며, 공지기술을 참조할 수 있다. 상기 부가 구성 요소는 "배경기술 - CRISPR/Cas 시스템 발현 벡터 설계" 섹션에서 설명된 구성 요소 중 하나 이상일 수 있다.

[696] 벡터 구성 - Cas12f1 단백질 발현 서열

[697] 상기 벡터 서열은 상기 Cas12f1 단백질을 암호화하는 핵산 서열을 포함할 수 있다. 이때, 상기 Cas12f1 단백질은 "엔지니어링 된 CRISPR/Cas12f1 복합체" 단락에서 설명된 것과 동일한 구성 및 특징을 가진다.

[698] 일 구현예로, 상기 벡터의 서열은 야생형의 Cas12f1 단백질을 암호화하는 서열을 포함할 수 있다. 이때, 상기 야생형의 Cas12f1 단백질은 Cas14a1일 수 있다. 일 구현예로, 상기 벡터의 서열은 Cas12f1 단백질을 암호화하는 인간 코돈 최적화된 핵산 서열을 포함할 수 있다. 이때, 상기 Cas12f1 단백질을 암호화하는 인간 코돈 최적화된 핵산 서열은 Cas14a1 단백질을 암호화하는 인간 코돈 최적화된 핵산 서열일 수 있다. 일 구현예로, 상기 벡터의 서열은 변형된 Cas12f1 단백질 또는 Cas12f1 융합 단백질을 암호화하는 서열을 포함할 수 있다. 일 구현예로, 상기 벡터의 서열은 표적 핵산의 이중가닥 중 하나의 가닥만 절단할 수 있고, 절단하지 않는 가닥에 대해 베이스 에디팅(Base editing) 또는 프라임 에디팅(Prime editing)을 할 수 있도록 변경된 Cas12f1 단백질을 암호화하는

서열을 포함할 수 있다. 일 구현예로, 상기 Cas12f1 단백질은 표적 핵산의 이중가닥 전부를 절단할 수 없고, 표적 핵산에 대해 베이스 에디팅(Base editing), 프라임 에디팅(Prime editing), 또는 유전자 발현 조절 기능을 할 수 있도록 변경된 Cas12f1 단백질을 암호화하는 서열을 포함할 수 있다.

[699] 벡터 구성 - 엔지니어링 된 Cas12f1 가이드 RNA 발현 서열

[700] 일 구현예로, 상기 벡터의 서열은 엔지니어링 된 Cas12f1 가이드 RNA를 암호화하는 서열을 포함할 수 있다. 예를 들어, 상기 벡터의 서열은 서열번호 210 내지 서열번호 258, 서열번호 381 내지 서열번호 393, 서열번호 395 내지 서열번호 407, 서열번호 409 내지 서열번호 421, 및 서열번호 436 내지 서열번호 439로 이루어진 군에서 선택된 서열을 포함할 수 있다.

[701] 일 구현예로, 상기 벡터의 서열은 둘 이상의 서로 다른 엔지니어링 된 Cas12f1 가이드 RNA를 암호화하는 서열을 포함할 수 있다. 예를 들어, 상기 벡터의 서열은 서열번호 210 내지 서열번호 258, 서열번호 381 내지 서열번호 393, 서열번호 395 내지 서열번호 407, 서열번호 409 내지 서열번호 421, 및 서열번호 436 내지 서열번호 439로 이루어진 군에서 각각 선택된 제1 엔지니어링 된 Cas12f1 가이드 RNA를 암호화하는 서열, 및 제2 엔지니어링 된 Cas12f1 가이드 RNA를 암호화하는 서열을 포함할 수 있다.

[702] 벡터 구성 - 프로모터 서열

[703] 상기 벡터 서열은 각 구성요소를 암호화하는 서열에 작동 가능하게 연결된 프로모터 서열을 포함한다. 구체적으로, 상기 프로모터 서열은 "배경기술 - CRISPR/Cas 시스템 발현 벡터 설계" 섹션 중 프로모터 부분에 개시된 프로모터 중 하나일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.

[704] 일 구현예로, 상기 벡터 서열은 Cas12f1 단백질을 암호화하는 서열, 및 프로모터 서열을 포함할 수 있다. 이때, 상기 프로모터 서열은 상기 Cas12f1 단백질을 암호화하는 서열과 작동 가능하게 연결된다. 일 구현예로, 상기 벡터 서열은 엔지니어링 된 Cas12f1 가이드 RNA를 암호화하는 서열, 및 프로모터 서열을 포함할 수 있다. 이때, 상기 프로모터 서열은 상기 엔지니어링 된 Cas12f1 가이드 RNA를 암호화하는 서열과 작동 가능하게 연결된다. 일 구현예로, 상기 벡터 서열은 Cas12f1 단백질을 암호화하는 서열, 엔지니어링 된 Cas12f1 가이드 RNA를 암호화하는 서열, 및 프로모터 서열을 포함할 수 있다. 이때, 상기 프로모터 서열은 상기 Cas12f1 단백질을 암호화하는 서열, 및 상기 엔지니어링 된 Cas12f1 가이드 RNA를 암호화하는 서열과 작동적으로 연결되며, 상기 프로모터 서열로 인해 활성화된 전사 인자가 상기 Cas12f1 단백질 및 상기 엔지니어링 된 Cas12f1 가이드 RNA를 발현시킨다.

[705] 벡터 구성 - 둘 이상의 프로모터 서열 포함 가능

[706] 일 구현예로, 상기 벡터 서열은 Cas12f1 단백질을 암호화하는 제1 서열, 제1 프로모터 서열, 엔지니어링 된 Cas12f1 가이드 RNA를 암호화하는 제2 서열, 및 제2 프로모터 서열을 포함할 수 있다. 이때, 상기 제1 프로모터 서열은 상기 제1

서열과 작동적으로 연결되고, 상기 제2 프로모터 서열은 상기 제2 서열과 작동적으로 연결되며, 상기 제1 프로모터 서열에 의해 상기 제1 서열의 전사가 유도되고, 상기 제2 프로모터 서열에 의해 상기 제2 서열의 전사가 유도된다. 이때, 상기 제1 프로모터 및 상기 제2 프로모터는 동일한 종류의 프로모터일 수 있다. 이때, 상기 제1 프로모터 및 상기 제2 프로모터는 상이한 종류의 프로모터일 수 있다.

- [707] 일 구현예로, 상기 벡터 서열은 Cas12f1 단백질을 암호화하는 제1 서열, 제1 프로모터 서열, 제1 엔지니어링 된 Cas12f1 가이드 RNA를 암호화하는 제2 서열, 제2 프로모터 서열, 제2 엔지니어링 된 Cas12f1 가이드 RNA를 암호화하는 제3 서열, 및 제3 프로모터 서열을 포함할 수 있다. 이때, 상기 제1 프로모터 서열은 상기 제1 서열과 작동적으로 연결되고, 상기 제2 프로모터 서열은 상기 제2 서열과 작동적으로 연결되고, 상기 제3 프로모터 서열은 상기 제3 서열과 작동적으로 연결되며, 상기 제1 프로모터 서열에 의해 상기 제1 서열의 전사가 유도되고, 상기 제2 프로모터 서열에 의해 상기 제2 서열의 전사가 유도되며, 상기 제3 프로모터 서열에 의해 상기 제3 서열의 전사가 유도된다. 이때, 상기 제2 프로모터 및 상기 제3 프로모터는 동일한 종류의 프로모터일 수 있다. 구체적으로, 상기 제2 프로모터 서열 및 상기 제3 프로모터 서열은 U6 프로모터 서열일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다. 이때, 상기 제2 프로모터 및 상기 제3 프로모터는 상이한 종류의 프로모터일 수 있다. 구체적으로, 상기 제2 프로모터는 U6 프로모터 서열, 상기 제3 프로모터는 H1 프로모터 서열일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

[708] 벡터 구성 - 종결 신호

- [709] 상기 벡터는 상기 프로모터 서열과 작동 가능하게 연결된 종결 신호를 포함할 수 있다. 이때, 상기 종결 신호는 "배경기술 - CRISPR/Cas 시스템 발현 벡터 설계" 섹션의 종결 신호 부분에서 개시된 종결 신호 중 하나일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다. 상기 종결 신호는, 프로모터 서열의 종류에 따라 달라질 수 있다.

- [710] 일 구현예로, 상기 벡터 서열이 U6 프로모터 서열을 포함하는 경우, 상기 U6 프로모터 서열과 작동 가능하게 연결된, 티미딘 연속 서열이 종결 신호로 작용할 수 있다. 일 구현예로, 상기 티미딘 연속 서열은 5개 이상의 티미딘이 연속으로 연결된 서열일 수 있다. 일 구현예로, 상기 벡터 서열이 H1 프로모터 서열을 포함하는 경우, 상기 H1 프로모터 서열과 작동 가능하게 연결된, 티미딘 연속 서열이 종결 신호로 작용할 수 있다. 일 구현예로, 상기 티미딘 연속 서열은 5개 이상의 티미딘이 연속으로 연결된 서열일 수 있다.

[711] 벡터 구성 - 기타 구성

- [712] 상기 벡터 서열은 상기 구성 외, 목적에 따라 필요한 구성요소를 포함할 수 있다.
- [713] 일 구현예로, 상기 벡터 서열은 조절/제어 구성요소 서열, 및/또는 부가 구성

요소 서열을 포함할 수 있다. 일 구현예로, 상기 부가 구성 요소는 형질주입된 세포를 비형질주입 세포로부터 구별하기 위한 목적으로 부가된 것일 수 있다. 이때, 상기 조절/제어 구성요소 서열 및 부가 구성 요소는 "배경기술 - CRISPR/Cas 시스템 발현 벡터 설계" 섹션에 개시된 것 중 하나일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

[714] 벡터 종류 - 바이러스 벡터

[715] 상기 벡터는 바이러스 벡터일 수 있다.

[716] 일 구현예로, 상기 바이러스 벡터는 레트로바이러스, 렌티바이러스, 아데노바이러스, 아데노-연관 바이러스, 백시니아바이러스, 폭스바이러스 및 단순포진 바이러스로 구성된 군에서 선택되는 하나 이상일 수 있다. 일 구현예로, 상기 바이러스 벡터는 아데노-연관 바이러스일 수 있다.

[717] 벡터 종류 - 비바이러스 벡터

[718] 상기 벡터는 비바이러스 벡터일 수 있다. 일 구현예로, 상기 비바이러스 벡터는 플라스미드, 파지, 나이키드 DNA, DNA 복합체, 및 mRNA로 구성된 군에서 선택되는 1 이상일 수 있다. 일 구현예로, 상기 플라스미드는 pcDNA 시리즈, pSC101, pG1796, pACYC177, ColE1, pKT230, pME290, pBR322, pUC8/9, pUC6, pBD9, pHC79, pIJ61, pLAFR1, pHV14, pGEX 시리즈, pET 시리즈, 및 pUC19으로 이루어진 군에서 선택된 것일 수 있다. 일 구현예로, 상기 파지는 λ gt4 λ B, λ -Charon, λ Δz1, 및 M13으로 이루어진 군에서 선택된 것일 수 있다. 일 구현예로, 상기 벡터는 PCR 앰플리콘(amplicon)일 수 있다.

[719] 벡터 형태 - 원형 또는 선형 벡터

[720] 상기 벡터는 원형 또는 선형 형태일 수 있다. 상기 벡터가 선형 벡터인 경우, 상기 선형 벡터 서열이 종결 신호를 따로 포함하지 않더라도, 그 3'말단에서 RNA 전사가 종결된다. 이와 비교하여, 상기 벡터가 원형 벡터인 경우, 상기 원형 벡터 서열이 종결 신호를 따로 포함하지 않는다면, RNA 전사가 종결되지 않게 된다. 따라서, 상기 벡터로 원형 벡터를 사용하는 경우, 의도한 대상을 발현하기 위해서는 각 프로모터 서열과 관련된 전사 인자에 대응하는 종결 신호가 포함되어야 한다.

[721] 일 구현예로, 상기 벡터는 선형 벡터일 수 있다. 일 구현예로, 상기 벡터는 선형의 앰플리콘일 수 있다. 일 구현예로, 상기 벡터는 서열번호 267 내지 서열번호 276에서 선택된 서열 및 서열번호 210 내지 258, 서열번호 381 내지 393, 서열번호 396 내지 서열번호 407, 및 서열번호 409 내지 서열번호 421로 이루어진 군에서 선택된 서열을 포함하는 선형 벡터일 수 있다. 일 구현예로, 상기 벡터는 원형 벡터일 수 있다. 일 구현예로, 상기 벡터는 서열번호 267 내지 서열번호 276에서 선택된 서열, 및 서열번호 210 내지 258, 서열번호 381 내지 393, 서열번호 396 내지 서열번호 407, 및 서열번호 409 내지 서열번호 421로 이루어진 군에서 선택된 서열을 포함하는 원형 벡터일 수 있다.

[722] 벡터 - 서열 예시

[723] 일 구현예로, 상기 벡터의 서열은 서열번호 267 내지 서열번호 276에서 선택된 서열, 및 서열번호 210 내지 258, 서열번호 381 내지 393, 서열번호 396 내지 서열번호 407, 및 서열번호 409 내지 서열번호 421로 이루어진 군에서 선택된 서열을 포함할 수 있다.

[724]

[725] 핵산의 화학적인 변형

[726] 본 명세서에서는 엔지니어링 된 crRNA 또는 이를 암호화하는 핵산, 엔지니어링 된 Cas12f1 가이드 RNA 또는 이를 암호화 하는 핵산, 및/또는 CRISPR/Cas12f1 시스템의 구성 요소를 발현시키기 위한 벡터 등 핵산을 포함하거나, 핵산으로 이루어진 구성 요소를 제공한다. 이때, 상기 구성 요소에서 "핵산"이라 함은, 자연계에 존재하는 DNA, 또는 RNA일 수 있고, 상기 구성 핵산의 일부 또는 전부에 화학적 변형이 일어난, 변형된 핵산일 수 있다. 일 구현예로, 상기 구성 핵산은 자연계에 존재하는 DNA, 및/또는 RNA일 수 있다. 일 구현예로, 상기 구성 핵산은 하나 이상의 뉴클레오타이드가 화학적으로 변형된 것일 수 있다. 이때, 상기 화학적 변형은 당업자에게 알려진 핵산의 변형을 모두 포함한다. 구체적으로, 상기 화학적 변형은 (WO 2019/089820 A1)에 기재된 핵산의 변형을 모두 포함할 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

[727]

[728] 엔지니어링 된 Cas12f1 가이드 RNA를 이용한 유전자 편집 방법

[729] 유전자 편집 방법 개관

[730] 본 명세서에서는 엔지니어링 된 crRNA를 이용하여 대상 세포 내의 표적 유전자, 또는 표적 핵산을 편집하는 방법을 제공한다. 상기 표적 유전자, 또는 표적 핵산은 표적 서열을 포함한다. 상기 표적 핵산은 단일가닥 DNA, 이중가닥 DNA, 및/또는 RNA일 수 있다. 상기 유전자 편집 방법은, 엔지니어링 된 Cas12f1 가이드 RNA, 및 Cas12f1 단백질, 또는 각각을 암호화하는 핵산을 표적 유전자, 또는 표적 핵산을 포함하고 있는 대상 세포 내에 전달하는 것을 포함한다. 그 결과, 상기 대상 세포 내에 엔지니어링 된 CRISPR/Cas12f1 복합체가 주입되거나, 엔지니어링 된 CRISPR/Cas12f1 복합체의 형성이 유도되며, 상기 엔지니어링 된 CRISPR/Cas12f1 복합체에 의해 표적 유전자가 편집된다. 상기 엔지니어링 된 Cas12f1 가이드 RNA는 "엔지니어링 된 Cas12f1 가이드 RNA" 단락에서 설명된 것과 동일한 특징 및 구조를 가진다. 상기 Cas12f1 단백질은 "엔지니어링 된 CRISPR/Cas12f1 복합체" 섹션에서 설명된 Cas12f1 단백질, 및/또는 변형된 Cas12f1 단백질과 동일한 특징 및 구성을 가진다.

[731] 일 구현예로, 상기 유전자 편집 방법은 Cas12f1 단백질 또는 이를 암호화하는 핵산, 및 엔지니어링 된 Cas12f1 가이드 RNA 또는 이를 암호화하는 핵산을 대상 세포 내로 전달하는 것을 포함할 수 있다.

[732] 이때, 상기 엔지니어링 된 Cas12f1 가이드 RNA는 엔지니어링 된 스캐폴드 영역, 및 스페이서를 포함한다.

- [733] 이때, 상기 엔지니어링 된 스캐폴드 영역은 전술한 "엔지니어링 된 스캐폴드 영역" 단락 중 어느 하나에서 서술된 것과 동일한 특징 및 구조를 가진다. 일 예로, 상기 엔지니어링 된 스캐폴드 영역은 서열번호 186 내지 167으로 이루어진 군에서 선택된 서열로 표현될 수 있다. 또 다른 예로, 상기 엔지니어링 된 스캐폴드 영역은 서열번호 187 내지 198으로 이루어진 군에서 선택된 서열로 표현될 수 있다. 또 다른 예로, 상기 엔지니어링 된 스캐폴드 영역은 서열번호 199 내지 205으로 이루어진 군에서 선택된 서열로 표현될 수 있다. 또 다른 예로, 상기 엔지니어링 된 스캐폴드 영역은 서열번호 206 내지 209으로 이루어진 군에서 선택된 서열로 표현될 수 있다.
- [734] 이때, 상기 스페이서 서열은 상기 대상 세포 내에 포함된 표적 유전자, 또는 표적 핵산과 상보적으로 결합할 수 있다.
- [735] 대상 세포
- [736] 일 구현예로, 상기 대상 세포는 원핵 세포일 수 있다. 일 구현예로, 상기 대상 세포는 진핵 세포일 수 있다. 구체적으로, 상기 진핵 세포는 식물 세포, 동물 세포, 및/또는 인간 세포일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.
- [737] 표적 서열 결정
- [738] CRISPR/Cas12f1 복합체로 편집하고자 하는 표적 유전자, 또는 표적 핵산, 및 표적 서열은 유전자 편집의 목적, 대상 세포 환경, Cas12f1 단백질이 인식하는 PAM 서열, 및/또는 기타 변수를 고려하여 결정할 수 있다. 이때, 적절한 길이의 표적 서열을 결정할 수 있다면, 그 방법은 특별히 제한되지 않으며, 공지된 기술을 활용할 수 있다.
- [739] 표적 서열에 따른 스페이서 서열 결정
- [740] 상기 표적 서열이 결정되고 나면, 이에 대응하는 스페이서 서열을 설계한다. 상기 스페이서 서열은 상기 표적 서열과 상보적으로 결합할 수 있는 서열로 설계된다. 일 구현예로, 상기 스페이서 서열은 상기 표적 유전자와 상보적으로 결합할 수 있는 서열로 설계된다. 일 구현예로, 상기 스페이서 서열은 상기 표적 핵산과 상보적으로 결합할 수 있도록 설계된다. 일 구현예로, 상기 스페이서 서열은 상기 표적 핵산의 표적 가닥 서열에 포함된 표적 서열과 상보적인 서열로 설계된다. 일 구현예로, 상기 스페이서 서열은 상기 표적 핵산의 비표적 가닥 서열에 포함된 프로토스페이서의 DNA 서열에 상응하는 RNA 서열로 설계된다. 구체적으로, 상기 스페이서 서열은, 상기 프로토스페이서 서열과 동일한 뉴클레오타이드 서열을 가지며, 상기 뉴클레오타이드 서열에 포함된 티미딘 각각이 모두 유리딘으로 치환된 서열로 설계된다.
- [741] 일 구현예에서, 상기 스페이서는 10 내지 50 뉴클레오타이드 길이를 가진다. 예를 들어, 10개, 11개, 12개, 13개, 14개, 15개, 16개, 17개, 18개, 19개, 20개, 21개, 22개, 23개, 24개, 25개, 26개, 27개, 28개, 29개, 30개, 31개, 32개, 33개, 34개, 35개, 36개, 37개, 38개, 39개, 40개, 41개, 42개, 43개, 44개, 45개, 46개, 47개, 48개, 49개 또는 50개의 뉴클레오타이드 길이를 가진다.

바람직하게는 17 개, 18 개, 19 개, 20 개, 21 개, 22 개, 23 개, 24 개 또는 25개의 뉴클레오타이드 길이를 가진다.

[742]

[743] 표적 서열과 스페이서 서열의 상보성

[744] 일 구현예로, 상기 스페이서 서열은 상기 표적 서열과 60%, 61%, 62%, 63%, 64%, 65%, 66%, 67%, 68%, 69%, 70%, 71%, 72%, 73%, 74%, 75%, 76%, 77%, 78%, 79%, 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 또는 100% 상보적인 서열일 수 있다. 일 구현예로, 상기 스페이서 서열은 상기 표적 서열과 바로 이전 문장에서 선택된 수치 범위 내 상보적인 서열일 수 있다. 예를 들어, 상기 스페이서 서열은 상기 표적 서열과 60% 내지 90% 상보적인 서열일 수 있다. 또 다른 예를 들어, 상기 스페이서 서열은 상기 표적 서열과 90% 내지 100% 상보적인 서열일 수 있다.

[745] 표적 서열과 스페이서 서열 간 미스매치 개수

[746] 일 구현예로, 상기 스페이서 서열은 상기 표적 서열과 0개, 1개, 2개, 3개, 4개, 5개, 6개, 7개, 8개, 9개, 또는 10개의 미스매치를 가지는 상보적인 서열일 수 있다. 일 구현예로, 상기 스페이서 서열은 바로 이전 문장에서 선택된 수치 범위 내의 미스매치를 가질 수 있다. 예를 들어, 상기 스페이서 서열은 상기 표적 서열과 0 개, 1 개, 2 개, 3 개, 4 개, 또는 5개의 미스매치를 가질 수 있다. 또 다른 예를 들어, 상기 스페이서 서열은 상기 표적 서열과 6개 내지 10개의 미스매치를 가질 수 있다.

[747] CRISPR/Cas12f1 복합체 이용

[748] 본 명세서에서 제공하는 유전자 편집 방법은 엔지니어링 된 CRISPR/Cas12f1 복합체가 표적 특이적으로 유전자, 또는 핵산을 절단하는 활성을 가지는 점을 이용한다. 상기 엔지니어링 된 CRISPR/Cas12f1 복합체는 "엔지니어링 된 CRISPR/Cas12f1 복합체" 섹션에서 설명된 엔지니어링 된 CRISPR/Cas12f1 복합체와 동일한 특징 및 구성을 가진다.

[749] CRISPR/Cas12f1 복합체 각 구성 요소의 세포 내 전달

[750] 본 명세서에서 제공하는 유전자 편집 방법은 대상 세포 내에서 엔지니어링 된 CRISPR/Cas12f1 복합체가 표적 유전자 또는 표적 핵산과 접촉하는 것을 포함한다. 따라서, 상기 엔지니어링 된 CRISPR/Cas12f1 복합체가 상기 표적 유전자, 또는 표적 핵산과 접촉하는 것을 유도하기 위해, 상기 유전자 편집 방법은 상기 엔지니어링 된 CRISPR/Cas12f1 복합체의 각 구성요소를 대상 세포 내에 전달하는 것을 포함한다. 일 구현예로, 상기 유전자 편집 방법은 엔지니어링 된 Cas12f1 가이드 RNA 또는 이를 암호화하는 핵산 및 Cas12f1 단백질 또는 이를 암호화하는 핵산을 대상 세포 내에 전달하는 것을 포함할 수 있다. 일 구현예로, 상기 유전자 편집 방법은 엔지니어링 된 Cas12f1 가이드 RNA 및 Cas12f1 단백질을 대상 세포 내에 전달하는 것을 포함할 수 있다. 일 구현예로, 상기 유전자 편집 방법은 엔지니어링 된 Cas12f1 가이드 RNA를 암호화하는 핵산 및

Cas12f1 단백질을 대상 세포 내에 전달하는 것을 포함할 수 있다. 일 구현예로, 상기 유전자 편집 방법은 엔지니어링 된 Cas12f1 가이드 RNA 및 Cas12f1 단백질을 암호화하는 핵산을 대상 세포 내에 전달하는 것을 포함할 수 있다. 일 구현예로, 상기 유전자 편집 방법은 엔지니어링 된 Cas12f1 가이드 RNA를 암호화하는 핵산 및 Cas12f1 단백질을 암호화하는 핵산을 대상 세포 내에 전달하는 것을 포함할 수 있다. 엔지니어링 된 Cas12f1 가이드 RNA 또는 이를 암호화하는 핵산, 및 Cas12f1 단백질 또는 이를 암호화하는 핵산은 다양한 전달 형태로, 다양한 전달 방법을 이용하여 대상 세포 내에 전달될 수 있다.

[751] 전달 형태 - RNP

[752] 상기 전달 형태로, 엔지니어링 된 Cas12f1 가이드 RNA 및 Cas12f1 단백질이 결합한 리보뉴클레오프로틴 입자(Ribonucleoprotein particle, RNP)를 이용할 수 있다. 일 구현예로, 상기 유전자 편집 방법은 엔지니어링 된 Cas12f1 가이드 RNA 및 Cas12f1 단백질이 결합한 CRISPR/Cas12f1 복합체를 대상 세포 내에 주입하는 것을 포함할 수 있다.

[753] 전달 형태 - 비바이러스 벡터

[754] 또 다른 전달 형태로, 엔지니어링 된 Cas12f1 가이드 RNA를 암호화하는 핵산 서열 및 Cas12f1 단백질을 암호화하는 핵산 서열을 포함하는 비바이러스 벡터를 이용할 수 있다. 일 구현예로, 상기 유전자 편집 방법은 엔지니어링 된 Cas12f1 가이드 RNA를 암호화하는 핵산 서열 및 Cas12f1 단백질을 암호화하는 핵산 서열을 포함하는 비바이러스 벡터를 대상 세포 내에 주입하는 것을 포함할 수 있다. 구체적으로, 상기 비바이러스 벡터는 플라스미드, 네이키드 DNA, DNA 복합체, 또는 mRNA일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다. 또 다른 구현예로, 상기 유전자 편집 방법은 엔지니어링 된 Cas12f1 가이드 RNA를 암호화하는 핵산 서열을 포함하는 제1 비바이러스 벡터, 및 Cas12f1 단백질을 암호화하는 핵산 서열을 포함하는 제2 비바이러스 벡터를 대상 세포 내에 주입하는 것을 포함할 수 있다. 구체적으로, 상기 제1 비바이러스 벡터 및 상기 제2 비바이러스 벡터는 각각 플라스미드, 네이키드 DNA, DNA 복합체, 및 mRNA로 이루어진 군에서 선택된 하나일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

[755] 전달 형태 - 바이러스 벡터

[756] 또 다른 전달 형태로, 엔지니어링 된 Cas12f1 가이드 RNA를 암호화하는 핵산 서열 및 Cas12f1 단백질을 암호화하는 핵산 서열을 포함하는 바이러스 벡터를 이용할 수 있다. 일 구현예로, 상기 유전자 편집 방법은 엔지니어링 된 Cas12f1 가이드 RNA를 암호화하는 핵산 서열 및 Cas12f1 단백질을 암호화하는 핵산 서열을 포함하는 바이러스 벡터를 대상 세포 내에 주입하는 것을 포함할 수 있다. 구체적으로, 상기 바이러스 벡터는 레트로바이러스, 렌티바이러스, 아데노바이러스, 아데노-연관 바이러스, 백시니아바이러스, 폭스바이러스 및 단순포진 바이러스로 구성된 군에서 선택된 하나일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다. 일 구현예로, 상기 바이러스 벡터는 아데노-연관 바이러스일 수

있다.

[757] 또 다른 구현예로, 상기 유전자 편집 방법은 엔지니어링 된 Cas12f1 가이드 RNA를 암호화하는 핵산 서열을 포함하는 제1 바이러스 벡터, 및 Cas12f1 단백질을 암호화하는 핵산 서열을 포함하는 제2 바이러스 벡터를 대상 세포 내에 주입하는 것을 포함할 수 있다. 구체적으로, 상기 제1 바이러스 벡터 및 제2 바이러스 벡터는 각각 레트로바이러스, 렌티바이러스, 아데노바이러스, 아데노-연관 바이러스, 백시니아바이러스, 폭스바이러스 및 단순포진 바이러스로 구성된 군에서 선택된 하나일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

[758] 전달 방법 - 일반적인 전달 수단

[759] 상기 전달 방법은, 세포 내로 엔지니어링 된 Cas12f1 가이드 RNA 또는 이를 암호화하는 핵산, 및 Cas12f1 단백질 또는 이를 암호화하는 핵산을 적절한 전달 형태로 세포 내로 전달할 수 있는 것이라면 특별히 제한되지 않는다. 일 구현예로, 상기 전달 방법은 전기천공법, 유전자총, 초음파천공법, 자기주입법(magnetofection), 및/또는 일시적인 세포 압축 또는 스퀴징일 수 있다.

[760] 전달 방법 - 나노파티클

[761] 상기 전달 방법은, 상기 CRISPR/Cas12f1 시스템에 포함된 적어도 하나의 구성요소를 나노파티클을 이용하여 전달하는 것일 수 있다. 이때, 상기 전달 방법은 당업계 통상의 기술자가 적절히 선택할 수 있는 공지된 방법일 수 있다. 예를 들어, 상기 나노파티클 전달 방법은 (WO 2019/089820 A1)에 개시된 방법일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

[762] 일 구현예로, 상기 전달 방법은 Cas12f1 단백질 또는 이를 암호화하는 핵산 및/또는 엔지니어링 된 Cas12f1 가이드 RNA 또는 이를 암호화하는 핵산을 나노파티클을 이용하여 전달하는 것일 수 있다. 일 구현예로, 상기 전달 방법은 Cas12f1 단백질 또는 이를 암호화하는 핵산, 제1 엔지니어링 된 Cas12f1 가이드 RNA 또는 이를 암호화하는 핵산, 및/또는 제2 엔지니어링 된 Cas12f1 가이드 RNA 또는 이를 암호화하는 핵산을 나노파티클을 이용하여 전달하는 것일 수 있다. 이때, 상기 전달 방법은 양이온성 리포솜법, 초산 리튬-DMSO, 지질-매개 형질감염(transfection), 인산칼슘 침전법(precipitation), lipofection, PEI(Polyethyleneimine)-매개 형질감염, DEAE-dextran 매개 형질감염, 및/또는 나노파티클-매개 핵산 전달(Panyam et., al Adv Drug Deliv Rev. 2012 Sep 13. pii: S0169-409X(12)00283-9. doi: 10.1016/j.addr.2012.09.023 참조)일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다. 이때, 상기 CRISPR/Cas12f1 시스템의 구성 요소는 RNP, 비바이러스 벡터, 및/또는 바이러스 벡터 형태일 수 있다. 예를 들어, 상기 CRISPR/Cas12f1 시스템의 구성 요소는 각 구성요소를 암호화하는 mRNA 형태일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

[763] 전달 형태 및 방법 - 조합 가능

[764] 상기 유전자 편집 방법은 엔지니어링 된 Cas12f1 가이드 RNA 또는 이를

암호화하는 핵산, 및 Cas12f1 단백질 또는 이를 암호화하는 핵산을 세포 내 전달하는 것을 포함하는데, 이때 상기 구성의 전달 형태 및/또는 전달 방법은 서로 동일하거나 상이할 수 있다. 일 구현예로, 상기 유전자 편집 방법은 엔지니어링 된 Cas12f1 가이드 RNA 또는 이를 암호화하는 핵산은 제1 전달 형태로 전달하고, Cas12f1 단백질 또는 이를 암호화하는 핵산은 제2 전달 형태로 전달하는 것을 포함할 수 있다. 이때, 상기 제1 전달 형태 및 상기 제2 전달 형태는 각각 전술한 전달 형태 중 어느 하나일 수 있다. 일 구현예로, 상기 유전자 편집 방법은 엔지니어링 된 Cas12f1 가이드 RNA 또는 이를 암호화하는 핵산은 제1 전달 방법으로 전달하고, Cas12f1 단백질 또는 이를 암호화하는 핵산은 제2 전달 방법으로 전달하는 것을 포함할 수 있다. 이때, 상기 제1 전달 방법 및 상기 제2 전달 방법은 각각 전술한 전달 방법 중 어느 하나일 수 있다.

[765] 전달 순서

[766] 상기 유전자 편집 방법은 엔지니어링 된 Cas12f1 가이드 RNA 또는 이를 암호화하는 핵산, 및 Cas12f1 단백질 또는 이를 암호화하는 핵산을 세포 내 전달하는 것을 포함하는데, 이때 상기 구성이 세포 내에 동시에 전달되거나 또는 시간차를 두고 순차적으로 전달될 수 있다.

[767] 일 구현예로, 상기 유전자 편집 방법은 엔지니어링 된 Cas12f1 가이드 RNA 또는 이를 암호화하는 핵산, 및 Cas12f1 단백질 또는 이를 암호화하는 핵산을 동시에 전달하는 것을 포함할 수 있다. 일 구현예로, 상기 유전자 편집 방법은 엔지니어링 된 Cas12f1 가이드 RNA 또는 이를 암호화하는 핵산을 세포 내로 전달한 후, Cas12f1 단백질 또는 이를 암호화하는 핵산을 세포 내로 전달하는 것을 포함할 수 있다. 일 구현예로, 상기 유전자 편집 방법은 Cas12f1 단백질 또는 이를 암호화하는 핵산을 세포 내로 전달한 후, 엔지니어링 된 Cas12f1 가이드 RNA를 세포 내로 전달하는 것을 포함할 수 있다. 일 구현예로, 상기 유전자 편집 방법은 Cas12f1 단백질을 암호화하는 핵산을 세포 내로 전달한 후, 엔지니어링 된 Cas12f1 가이드 RNA를 세포 내로 전달하는 것을 포함할 수 있다.

[768] 복수의 엔지니어링 된 Cas12f1 가이드 RNA 또는 이를 암호화하는 핵산 전달

[769] 본 명세서에서 제공하는 유전자 편집 방법은 대상 세포 내에 Cas12f1 단백질 또는 이를 암호화하는 핵산, 및 둘 이상의 엔지니어링 된 Cas12f1 가이드 RNA 또는 이를 암호화하는 핵산을 전달하는 것을 포함할 수 있다. 상기 방법을 통해, 서로 다른 서열을 표적하는 둘 이상의 CRISPR/Cas12f1 복합체가 대상 세포 내에 도입되거나, 대상 세포 내에서 형성될 수 있다. 그 결과, 세포 내에 포함된 서로 다른 둘 이상의 표적 유전자, 또는 표적 핵산이 편집될 수 있다. 일 구현예로, 상기 유전자 편집 방법은 Cas12f1 단백질 또는 이를 암호화하는 핵산, 제1 엔지니어링 된 Cas12f1 가이드 RNA 또는 이를 암호화하는 핵산, 및 제2 엔지니어링 된 Cas12f1 가이드 RNA 또는 이를 암호화하는 핵산을 표적 유전자 또는 표적 핵산을 포함하고 있는 대상 세포 내에 전달하는 것을 포함한다. 이때, 상기 각 구성요소는 전술한 전달 형태 및 전달 방법 중 하나 이상을 사용하여

세포 내로 전달될 수 있다. 이때, 둘 이상의 구성요소가 세포 내에 동시에 전달될 수 있고, 또는 순차적으로 전달될 수 있다.

[770] CRISPR/Cas12f1 복합체가 표적 핵산과 접촉

[771] 본 명세서에서 제공하는 유전자 편집 방법에서, 표적 유전자, 또는 표적 핵산의 편집은 대상 세포 내에서 엔지니어링 된 CRISPR/Cas12f1 복합체가 표적 유전자 또는 표적 핵산과 접촉하면서 이루어진다. 따라서, 상기 유전자 편집 방법은 엔지니어링 된 CRISPR/Cas12f1 복합체가 대상 세포 내에서 접촉하도록 하거나, 접촉을 유도하는 것을 포함할 수 있다. 일 구현예로, 상기 유전자 편집 방법은 엔지니어링 된 CRISPR/Cas12f1 복합체가 대상 세포 내에서 표적 핵산과 접촉하는 것을 포함할 수 있다. 일 구현예로, 상기 유전자 편집 방법은 엔지니어링 된 CRISPR/Cas12f1 복합체가 대상 세포 내에서 표적 핵산과 접촉하도록 유도하는 것을 포함할 수 있다. 이때, 상기 유도는 상기 엔지니어링 된 CRISPR/Cas12f1 복합체가 세포 내에서 표적 핵산과 접촉하도록 하는 방법이라면 특별히 제한되지 않는다. 일 구현예로, 상기 유도는 엔지니어링 된 Cas12f1 가이드 RNA 또는 이를 암호화하는 핵산, 및 Cas12f1 단백질 또는 이를 암호화하는 핵산을 세포 내에 전달하는 것일 수 있다.

[772] 유전자 편집 결과 - 인델(indel)

[773] 본 명세서에서 제공하는 유전자 편집 방법의 수행 결과로, 표적 유전자 또는 표적 핵산에 인델이 발생할 수 있다. 이때, 상기 인델은 표적 서열 부분 및/또는 프로토스페이서 서열 부분의 내부 및/또는 외부에서 일어날 수 있다. 상기 인델은, 유전자 편집 전 핵산의 뉴클레오타이드 배열에서 일부 뉴클레오타이드가 중간에 결실되거나, 임의의 뉴클레오타이드가 삽입되거나, 및/또는 상기 삽입과 결실이 혼입된 변이를 일컫는다. 일반적으로, 표적 유전자 또는 표적 핵산 서열 내 인델이 일어나면, 해당 유전자 또는 핵산이 불활성화된다. 일 구현예로, 상기 유전자 편집 방법의 수행 결과, 표적 유전자 또는 표적 핵산 내 하나 이상의 뉴클레오타이드가 결실 및/또는 추가될 수 있다.

[774] 유전자 편집 결과 - 베이스 에디팅(base editing)

[775] 본 명세서에서 제공하는 유전자 편집 방법의 수행 결과로, 표적 유전자 또는 표적 핵산 내 베이스 에디팅이 일어날 수 있다. 이는 표적 유전자 또는 표적 핵산 내 임의의 뉴클레오타이드가 결실, 또는 추가되는 인델과는 달리, 핵산 내 하나 이상의 특정 뉴클레오타이드를 의도한 대로 변경하는 것을 의미한다. 달리 표현하면, 표적 유전자 또는 표적 핵산 내 특정 위치에서, 미리 의도한 점 돌연변이(point mutation)를 일으키는 것이다. 일 구현예로, 상기 유전자 편집 방법의 수행 결과, 표적 유전자 또는 표적 핵산 내 하나 이상의 뉴클레오타이드가 다른 뉴클레오타이드로 치환될 수 있다.

[776] 유전자 편집 결과 - 삽입(insertion)

[777] 본 명세서에서 제공하는 유전자 편집 방법의 수행 결과로, 표적 유전자 또는 표적 핵산 내 핵인이 발생할 수 있다. 상기 핵인은 표적 유전자 또는 표적 핵산

서열 내에 추가적인 핵산 서열을 삽입하는 것을 의미한다. 상기 핵인이 일어나려면, CRISPR/Cas12f1 복합체 외에 상기 추가적인 핵산 서열을 포함하는 도너가 더 필요하다. 세포 내에서 CRISPR/Cas12f1 복합체가 표적 유전자 또는 표적 핵산을 절단하는 경우, 상기 절단된 표적 유전자 또는 표적 핵산의 수복이 일어나게 된다. 이때, 상기 도너가 상기 수복 과정에 관여하여 상기 추가적인 핵산 서열이 표적 유전자 또는 표적 핵산 내에 삽입될 수 있도록 한다. 일 구현예로, 상기 유전자 편집 방법은 대상 세포 내로 도너를 도입하는 것을 추가적으로 포함할 수 있다. 예를 들어, 상기 도너는 세포 내 게놈에 삽입하기 위한 외래 DNA(exogenous DNA sequence)를 포함하며, 상기 도너에 의해 상기 표적 유전자 또는 상기 표적 핵산 내 상기 외래 DNA 서열의 삽입이 유도된다. 이때, 상기 도너를 대상 세포 내로 전달할 때, 전술한 전달 형태 및/또는 전달 방법이 사용될 수 있다.

[778] 유전자 편집 결과 - 제거(deletion)

[779] 본 명세서에서 제공하는 유전자 편집 방법의 수행 결과로, 표적 유전자 또는 표적 핵산 서열의 전부 또는 일부를 제거할 수 있다. 상기 제거는 상기 표적 유전자 또는 상기 표적 핵산 내 일부 염기 서열(뉴클레오타이드 서열)을 일정 길이 이상 제거하는 것을 의미한다. 상기 제거는 전술한 인텔 효과와 비교하여, 유전자의 특정 영역, 예를 들어, 제1 엑손 영역을 전체적으로 제거(removal)할 수 있는 효과를 의미한다.

[780] 일 구현예로, 상기 유전자 편집 방법은 Cas12f1 단백질 또는 이를 암호화하는 핵산, 제1 엔지니어링 된 Cas12f1 가이드 RNA 또는 이를 암호화하는 핵산, 및 제2 엔지니어링 된 Cas12f1 가이드 RNA 또는 이를 암호화하는 핵산을 표적 유전자 또는 표적 핵산을 포함하는 세포내에 도입하는 것을 포함한다. 이로 인해, 상기 유전자 편집 결과 표적 유전자 또는 표적 핵산 내에 특정 서열 부분의 제거가 일어난다.

[781] 유전자 편집 방법 예시

[782] 일 구현예로, 상기 유전자 편집 방법은 엔지니어링 된 Cas12f1 가이드 RNA 및 Cas12f1 단백질이 결합한 리보뉴클레오프로틴 입자 형태의 CRISPR/Cas12f1 복합체를 진핵 세포 내에 전달하는 것을 포함할 수 있다. 이때, 상기 전달은 전기천공법, 또는 lipofection을 이용한 것일 수 있다.

[783] 일 구현예로, 상기 유전자 편집 방법은 엔지니어링 된 Cas12f1 가이드 RNA를 암호화하는 핵산 및 Cas12f1 단백질을 암호화하는 핵산을 진핵 세포 내에 전달하는 것을 포함할 수 있다. 이때, 상기 전달은 전기천공법, 또는 lipofection을 이용한 것일 수 있다.

[784] 일 구현예로, 상기 유전자 편집 방법은 엔지니어링 된 Cas12f1 가이드 RNA를 암호화하는 핵산 서열 및 Cas12f1 단백질을 암호화하는 핵산 서열을 포함하는 아데노-연관 바이러스(AAV) 벡터를 진핵세포 내에 전달하는 것을 포함할 수 있다.

[785] 일 구현예로, 상기 유전자 편집 방법은 제1 엔지니어링 된 Cas12f1 가이드 RNA를 암호화하는 핵산 서열, 제2 엔지니어링 된 Cas12f1 가이드 RNA를 암호화하는 핵산 서열, 및 Cas12f1 단백질을 암호화하는 핵산 서열을 포함하는 아데노-연관 바이러스(AAV) 벡터를 진핵세포 내에 전달하는 것을 포함할 수 있다.

[786]

[787] 발명의 가능한 실시예

[788] 실시예 1, sgRNA ver.A, MF

[789] 다음을 포함하는, CRISPR/Cas12f1 시스템을 위한 엔지니어링 된 가이드 RNA:

[790] 엔지니어링 된 스캐폴드 영역; 및

[791] 스페이서;

[792] 이때, 상기 엔지니어링 된 가이드 RNA는 5'말단에서 3'말단 방향으로, 엔지니어링 된 스캐폴드 영역, 및 스페이서가 순서대로 연결되어 있고,

[793] 상기 스페이서는 10개 이상 50개 이하의 뉴클레오타이드를 포함하며, 표적 서열과 상보적인 서열을 가지고,

[794] 상기 엔지니어링 된 스캐폴드 영역의 서열은

5'-CUUCACUGAUAAAGUGGAGAACCGCUUCACCAAAAGCUGUCCCUUAGG
GGAUUAGAACUUGAGUGAAGGUGGGCUGCUUGCAUCAGCCUAAUGUCGA
GAAGUGCUUUCUUCGGAAAGUAACCCUCGAAACAAAUUCAUUUGAAAGA
AUGAAGGAAUGCAAC-3'(서열번호 7)과 상이한 것을 특징으로 하며,

[795] 상기 엔지니어링 된 스캐폴드 영역의 서열은 5'말단에서 3'말단 방향으로 다음 서열이 순서대로 연결된 것임:

[796] 5'-A-3', 5'-AA-3', 5'-GAA-3', 5'-AGAA-3', 5'-GAGAA-3', 5'-GGAGAA-3',
5'-UGGAGAA-3', 5'-GUGGAGAA-3', 5'-AGUGGAGAA-3',
5'-AAGUGGAGAA-3'(서열번호 16), 5'-AAAGUGGAGAA-3'(서열번호 17),
5'-UAAAGUGGAGAA-3'(서열번호 18), 5'-AUAAAGUGGAGAA-3'(서열번호 19),
5'-GAUAAAGUGGAGAA-3'(서열번호 20),
5'-UGAUAAAGUGGAGAA-3'(서열번호 21),
5'-CUGAUAAAGUGGAGAA-3'(서열번호 22),
5'-ACUGAUAAAGUGGAGAA-3'(서열번호 23),
5'-CACUGAUAAAGUGGAGAA-3'(서열번호 24),
5'-UCACUGAUAAAGUGGAGAA-3'(서열번호 25),
5'-UUCACUGAUAAAGUGGAGAA-3'(서열번호 26), 및
5'-CUUCACUGAUAAAGUGGAGAA-3'(서열번호 9)로 이루어진 군에서 선택된 서열;

[797] 5'-CCGCUUCACUAGAGUGAAGGUGG-3'(서열번호 430),

5'-CCGCUUCACCUAGGAGUGAAGGUGG-3'(서열번호 431),

5'-CCGCUUCACCAUAGUGAGUGAAGGUGG-3'(서열번호 38),

- 5'-CCGCUUCACCAAUUAGUUGAGUGAAGGUGG-3'(서열번호 39),
 5'-CCGCUUCACCAAUUAGCUUGAGUGAAGGUGG-3'(서열번호 40),
 5'-CCGCUUCACCAAAAUUAGACUUGAGUGAAGGUGG-3'(서열번호 41),
 5'-CCGCUUCACCAAAAAGUUAGAACUUGAGUGAAGGUGG-3'(서열번호 42),
 5'-CCGCUUCACCAAAAAGCUUAGGAACUUGAGUGAAGGUGG-3'(서열번호 43),
 5'-CCGCUUCACCAAAAAGCUUUAGAGAACUUGAGUGAAGGUGG-3'(서열번호 44),
 5'-CCGCUUCACCAAAAAGCUGUUAGUUAGAACUUGAGUGAAGGUGG-3'(서열번호 45),
 5'-CCGCUUCACCAAAAAGCUGUUAGUAGAACUUGAGUGAAGGUGG-3'(서열번호 46),
 5'-CCGCUUCACCAAAAAGCUGUUUAGAUUAGAACUUGAGUGAAGGUGG-3'(서열번호 47),
 5'-CCGCUUCACCAAAAAGCUGUCUUAGGAUUAGAACUUGAGUGAAGGUGG-3'(서열번호 48),
 5'-CCGCUUCACCAAAAAGCUGUCCUUAGGGAUUAGAACUUGAGUGAAGGUGG-3'(서열번호 49), 및
 5'-CCGCUUCACCAAAAAGCUGUCCCUUAGGGGAUUAGAACUUGAGUGAAGGUGG-3'(서열번호 10)로 이루어진 군에서 선택된 서열;
- [798] 5'-GCUGCUUGCAUCAGCCUAAUGUCGAGAAGUGCUUUCUUCGGAAAGUAACCCUCGA-3'(서열번호 11);
- [799] 5'-AACAAAGAAAGGA-3'(서열번호 110),
 5'-AACAAAUGAAAAGGA-3'(서열번호 111),
 5'-AACAAAUUGAAAAAGGA-3'(서열번호 112),
 5'-AACAAAUUCGAAAGAAGGA-3'(서열번호 113),
 5'-AACAAAUUCAGAAAUGAAGGA-3'(서열번호 114),
 5'-AACAAAUUCAUGAAAAUGAAGGA-3'(서열번호 115),
 5'-AACAAAUUCAUUGAAAAAUGAAGGA-3'(서열번호 116), 및
 5'-AACAAAUUCAUUUGAAAGAAUGAAGGA-3'(서열번호 117)에서 선택된 서열; 및
- [800] 5'-AUGCAAC-3'.
- [801] 실시예 2. sgRNA ver.A. WT
- [802] 다음을 포함하는, CRISPR/Cas12f1 시스템을 위한 엔지니어링 된 가이드 RNA:
- [803] 엔지니어링 된 스캐폴드 영역; 및
- [804] 스페이서; 및
- [805] 이때, 상기 엔지니어링 된 가이드 RNA는 5'말단에서 3'말단 방향으로, 엔지니어링 된 스캐폴드 영역, 및 스페이서가 순서대로 연결되어 있고,

- [806] 상기 스페이서는 10개 이상 50개 이하의 뉴클레오타이드를 포함하며, 표적 서열과 상보적인 서열을 가지고,
- [807] 상기 엔지니어링 된 스캐폴드 영역의 서열은
 5'-CUUCACUGAUAAAGUGGAGAACCGCUUCACCAAAAGCUGUCCCUUAGG
 GGAUUAGAACUUGAGUGAAGGUGGGCUGCUUGCAUCAGCCUAAUGUCGA
 GAAGUGCUUUCUUCGGAAAGUAACCCUCGAAACAAAUUCAUUUUUCCUC
 UCCAAUUCUGCACAAGAAAGUUGCAGAACCCGAAUAGACGAAUGAAGGA
 AUGCAAC-3'(서열번호 315)과 상이한 것을 특징으로 하며,
- [808] 상기 엔지니어링 된 스캐폴드 영역의 서열은 5'말단에서 3'말단 방향으로 다음 서열이 순서대로 연결된 것임:
- [809] 5'-A-3', 5'-AA-3', 5'-GAA-3', 5'-AGAA-3', 5'-GAGAA-3', 5'-GGAGAA-3',
 5'-UGGAGAA-3', 5'-GUGGAGAA-3', 5'-AGUGGAGAA-3',
 5'-AAGUGGAGAA-3'(서열번호 16), 5'-AAAGUGGAGAA-3'(서열번호 17),
 5'-UAAAGUGGAGAA-3'(서열번호 18), 5'-AUAAAGUGGAGAA-3'(서열번호 19),
 5'-GAUAAAGUGGAGAA-3'(서열번호 20),
 5'-UGAUAAAGUGGAGAA-3'(서열번호 21),
 5'-CUGAUAAAGUGGAGAA-3'(서열번호 22),
 5'-ACUGAUAAAGUGGAGAA-3'(서열번호 23),
 5'-CACUGAUAAAGUGGAGAA-3'(서열번호 24),
 5'-UCACUGAUAAAGUGGAGAA-3'(서열번호 25),
 5'-UUCACUGAUAAAGUGGAGAA-3'(서열번호 26), 및
 5'-CUUCACUGAUAAAGUGGAGAA-3'(서열번호 9)로 이루어진 군에서 선택된 서열;
- [810] 5'-CCGCUUCACUAGAGUGAAGGUGG-3'(서열번호 430),
 5'-CCGCUUCACCUAGGAGUGAAGGUGG-3'(서열번호 431),
 5'-CCGCUUCACCAUAGUGAGUGAAGGUGG-3'(서열번호 38),
 5'-CCGCUUCACCAAUAGUUGAGUGAAGGUGG-3'(서열번호 39),
 5'-CCGCUUCACCAAAUAGCUUGAGUGAAGGUGG-3'(서열번호 40),
 5'-CCGCUUCACCAAAAUAGACUUGAGUGAAGGUGG-3'(서열번호 41),
 5'-CCGCUUCACCAAAAGUAGAACUUGAGUGAAGGUGG-3'(서열번호 42),
 5'-CCGCUUCACCAAAAGCUUAGGAACUUGAGUGAAGGUGG-3'(서열번호 43),
 5'-CCGCUUCACCAAAAGCUUUAGAGAACUUGAGUGAAGGUGG-3'(서열번호 44),
 5'-CCGCUUCACCAAAAGCUGUUAGUAGAACUUGAGUGAAGGUGG-3'(서열번호 45),
 5'-CCGCUUCACCAAAAGCUGUUAGUAGAACUUGAGUGAAGGUGG-3'(서열번호 46),

5'-CCGCUUCACCAAAAAGCUGUUUAGAUUAGAACUUGAGUGAAGGUGG-3'(서열번호 47),

5'-CCGCUUCACCAAAAAGCUGUCUUAGGAUUAGAACUUGAGUGAAGGUGG-3'(서열번호 48),

5'-CCGCUUCACCAAAAAGCUGUCCUUAGGGAUUAGAACUUGAGUGAAGGUGG-3'(서열번호 49), 및

5'-CCGCUUCACCAAAAAGCUGUCCCUUAGGGGAUUAGAACUUGAGUGAAGGUGG-3'(서열번호 10)로 이루어진 군에서 선택된 서열;

[811] 5'-GCUGCUUGCAUCAGCCUAAUGUCGAGAAGUGCUUUCUUCGGAAAGUAACCCUCGA-3'(서열번호 11);

[812] 5'-AACAAAGAAAGGA-3'(서열번호 110),

5'-AACAAAUGAAAAGGA-3'(서열번호 111),

5'-AACAAAUUGAAAAAGGA-3'(서열번호 112),

5'-AACAAAUUCGAAAGAAGGA-3'(서열번호 113),

5'-AACAAAUUCAGAAAUGAAGGA-3'(서열번호 114),

5'-AACAAAUUCAUGAAAAUGAAGGA-3'(서열번호 115),

5'-AACAAAUUCAUUGAAAAAUGAAGGA-3'(서열번호 116),

5'-AACAAAUUCAUUUGAAAGAAUGAAGGA-3'(서열번호 117),

5'-AACAAAUUCAUUUUGAAACGAAUGAAGGA-3'(서열번호 293),

5'-AACAAAUUCAUUUUUGAAAACGAAUGAAGGA-3'(서열번호 294),

5'-AACAAAUUCAUUUUUCGAAAGACGAAUGAAGGA-3'(서열번호 295),

5'-AACAAAUUCAUUUUUCCGAAAAGACGAAUGAAGGA-3'(서열번호 296),

5'-AACAAAUUCAUUUUUCCUGAAAUAGACGAAUGAAGGA-3'(서열번호 297),

5'-AACAAAUUCAUUUUUCCUCGAAAAUAGACGAAUGAAGGA-3'(서열번호 298),

5'-AACAAAUUCAUUUUUCCUCUGAAAAAUAGACGAAUGAAGGA-3'(서열번호 299),

5'-AACAAAUUCAUUUUUCCUCUCGAAAGAAUAGACGAAUGAAGGA-3'(서열번호 300),

5'-AACAAAUUCAUUUUUCCUCUCCGAAACGAAUAGACGAAUGAAGGA-3'(서열번호 301),

5'-AACAAAUUCAUUUUUCCUCUCCAGAAACCGAAUAGACGAAUGAAGGA-3'(서열번호 302),

5'-AACAAAUUCAUUUUUCCUCUCCAAGAAACCCGAAUAGACGAAUGAAGGA-3'(서열번호 303),

5'-AACAAAUUCAUUUUUCCUCUCCAUGAAAACCCGAAUAGACGAAUGAAGGA-3'(서열번호 304),

5'-AACAAAUUCAUUUUCCUCUCCAAUUGAAAAACCCGAAUAGACGAAU
GAAGGA-3'(서열번호 305),
5'-AACAAAUUCAUUUUCCUCUCCAAUUCGAAAGAACCCGAAUAGACGAA
UGAAGGA-3'(서열번호 306),
5'-AACAAAUUCAUUUUCCUCUCCAAUUCUGAAAAGAACCCGAAUAGACG
AAUGAAGGA-3'(서열번호 307),
5'-AACAAAUUCAUUUUCCUCUCCAAUUCUGGAAACAGAACCCGAAUAGA
CGAAUGAAGGA-3'(서열번호 308),
5'-AACAAAUUCAUUUUCCUCUCCAAUUCUGCGAAAGCAGAACCCGAAUA
GACGAAUGAAGGA-3'(서열번호 309),
5'-AACAAAUUCAUUUUCCUCUCCAAUUCUGCAGAAAUGCAGAACCCGAA
UAGACGAAUGAAGGA-3'(서열번호 310),
5'-AACAAAUUCAUUUUCCUCUCCAAUUCUGCACGAAAUUGCAGAACCCG
AAUAGACGAAUGAAGGA-3'(서열번호 311),
5'-AACAAAUUCAUUUUCCUCUCCAAUUCUGCACAGAAAGUUGCAGAACC
CGAAUAGACGAAUGAAGGA-3'(서열번호 312),
5'-AACAAAUUCAUUUUCCUCUCCAAUUCUGCACAGAAAUUGCAGAACCC
GAAUAGACGAAUGAAGGA-3'(서열번호 313), 및
5'-AACAAAUUCAUUUUCCUCUCCAAUUCUGCACAAGAAAGUUGCAGAAC
CCGAAUAGACGAAUGAAGGA-3'(서열번호 314)로 이루어진 군에서 선택된
서열; 및

[813] 5'-AUGCAAC-3'.

[814] 실시예 3, sgRNA ver.A, v4.0

[815] 실시예 1에 있어서, 상기 스캐폴드 영역의 서열은 5'말단에서 3'말단 방향으로
다음 서열이 순서대로 연결된 것을 특징으로 하는 엔지니어링 된 가이드 RNA:

[816] 5'-A-3';

[817] 5'-CCGCUUCACCAAAAGCUGUCCCUUAGGGGAUUAGAACUUGAGUGAA
GGUGG-3'(서열번호 10);

[818] 5'-GCUGCUUGCAUCAGCCUAAUGUCGAGAAGUGCUUUCUUCGGAAAGU
AACCCUCGA-3'(서열번호 11);

[819] 5'-AACAAAGAAAGGA-3'(서열번호 110); 및

[820] 5'-AUGCAAC-3'.

[821] 실시예 4, sgRNA ver.A, v4.1

[822] 실시예 1에 있어서, 상기 스캐폴드 영역의 서열은 5'말단에서 3'말단 방향으로
다음 서열이 순서대로 연결된 것을 특징으로 하는 엔지니어링 된 가이드 RNA:
5'-A-3';

[823] 5'-CCGCUUCACUUAGAGUGAAGGUGG-3'(서열번호 430);

[824] 5'-GCUGCUUGCAUCAGCCUAAUGUCGAGAAGUGCUUUCUUCGGAAAGU

AACCCUCGA-3'(서열번호 11);

- [825] 5'-AACAAAGAAAGGA-3'(서열번호 110); 및
- [826] 5'-AUGCAAC-3'.
- [827] 실시예 5, sgRNA ver.B
- [828] 다음을 포함하는, CRISPR/Cas12f1 시스템을 위한 엔지니어링 된 가이드 RNA:
- [829] 엔지니어링 된 스캐폴드; 및
- [830] 스페이서,
- [831] 이때, 상기 엔지니어링 된 가이드 RNA는 5'말단에서 3'말단 방향으로,
엔지니어링 된 스캐폴드 영역, 및 스페이서가 순서대로 연결되어 있고,
- [832] 상기 스페이서는 10 내지 50 뉴클레오타이드 길이를 가지며, 표적 서열과
상보적인 서열을 가지며,
- [833] 상기 엔지니어링 된 스캐폴드 영역의 서열은 5'말단에서 3'말단 방향으로 다음
서열이 순서대로 연결된 것임: 5'-A-3'로 표현되는 제1 서열;
- [834] 5'-CCGCUUCAC-3'(서열번호 432)로 표현되는 제2 서열;
- [835] 5'-UUAG-3'로 표현되는 제3 서열;
- [836] 5'-AGUGAAGGUGG-3'(서열번호 433)로 표현되는 제4 서열;
- [837] 5'-GCUGCUUGCAUCAGCCUAAUGUCGAGAAGUGCUUUCUUCGGAAAGU
AACCCUCGA-3'(서열번호 11)로 표현되는 제5 서열;
- [838] 5'-AACAAA-3'로 표현되는 제6 서열;
- [839] 링커;
- [840] 5'-GGA-3'로 표현되는 제7 서열; 및
- [841] 5'-AUGCAAC-3'로 표현되는 제8 서열.
- [842] 실시예 6, sgRNA ver.B, Linker
- [843] 실시예 5에 있어서, 상기 링커는 5'-GAAA-3'인 것을 특징으로 하는 엔지니어링
된 가이드 RNA.
- [844] 실시예 7, sgRNA ver.B, Linker variations
- [845] 실시예 5에 있어서, 상기 링커는 5'-GAAA-3', 5'-UGAAAA-3',
5'-UUGAAAAA-3', 5'-UUCGAAAGAA-3'(서열번호 425),
5'-UUCAGAAAUGAA-3'(서열번호 426), 5'-UUCAUGAAAAUGAA-3'(서열번호
427), 및 5'-UUCAUUGAAAAAUGAA-3'(서열번호 428)로 이루어진 군에서
선택된 것을 특징으로 하는 엔지니어링 된 가이드 RNA.
- [846] 실시예 8, sgRNA ver.B, + 1st region variations
- [847] 실시예 5에 있어서, 상기 엔지니어링 된 스캐폴드 영역의 서열은 5'-A-3',
5'-GA-3', 5'-AGA-3', 5'-GAGA-3', 5'-GGAGA-3', 5'-UGGAGA-3', 5'-GUGGAGA-3',
5'-AGUGGAGA-3', 5'-AAGUGGAGA-3', 5'-AAAGUGGAGA-3'(서열번호 27),
5'-UAAAGUGGAGA-3'(서열번호 28), 5'-AUAAAGUGGAGA-3'(서열번호 29),
5'-GAUAAAGUGGAGA-3'(서열번호 30), 5'-UGAUAAAGUGGAGA-3'(서열번호
31), 5'-CUGAUAAAGUGGAGA-3'(서열번호 32),

5'-ACUGAUAAAGUGGAGA-3'(서열번호 33),
 5'-CACUGAUAAAGUGGAGA-3'(서열번호 34),
 5'-UCACUGAUAAAGUGGAGA-3'(서열번호 35),
 5'-UUCACUGAUAAAGUGGAGA-3'(서열번호 36), 및
 5'-CUUCACUGAUAAAGUGGAGA-3'(서열번호 37)로 이루어진 군에서 선택된
 제9 서열을 추가적으로 포함하며, 상기 제9 서열의 3'말단은 상기 제1 서열의
 5'말단과 연결되어 있는 것을 특징으로 하는 엔지니어링 된 가이드 RNA.

- [848] 실시예 9, sgRNA ver.B, + 2nd region variations
- [849] 실시예 5에 있어서, 상기 엔지니어링 된 스캐폴드 영역의 서열은,
- [850] 5'-A-3', 5'-AA-3', 5'-AAA-3', 5'-AAAG-3', 5'-AAAGC-3', 5'-AAAGCU-3',
 5'-AAAGCUG-3', 5'-AAAGCUGU-3', 5'-AAAGCUGUC-3',
 5'-AAAGCUGUCC-3'(서열번호 52), 및 5'-AAAGCUGUCCC-3'(서열번호 53)로
 이루어진 군에서 선택된 제10 서열, 및
- [851] 5'-U-3', 5'-CU-3', 5'-ACU-3', 5'-AACU-3', 5'-GAACU-3', 5'-AGAACU-3',
 5'-UAGAACU-3', 5'-UUAGAACU-3', 5'-AUUAGAACU-3',
 5'-GAUUAGAACU-3'(서열번호 54), 5'-GGAUUAGAACU-3'(서열번호 55), 및
 5'-GGGAUUAGAACU-3'(서열번호 56)로 이루어진 군에서 선택된 제11 서열을
 추가적으로 포함하며,
- [852] 상기 제2 서열의 3'말단 및 상기 제3 서열의 5'말단은 상기 제10 서열을 통해
 연결되어 있고,
- [853] 상기 제3 서열의 3'말단 및 상기 제4 서열의 5'말단은 상기 제11 서열을 통해
 연결되어 있는 것을 특징으로 하는 엔지니어링 된 가이드 RNA.
- [854] 실시예 10, sgRNA ver.B, + 2nd region examples
- [855] 실시예 9에 있어서,
- [856] 상기 제10 서열이 5'-A-3'인 경우, 상기 제11 서열은 5'-U-3'이고,
- [857] 상기 제10 서열이 5'-AA-3'인 경우, 상기 제11 서열은 5'-CU-3'이고,
- [858] 상기 제10 서열이 5'-AAA-3'인 경우, 상기 제11 서열은 5'-ACU-3'이고,
- [859] 상기 제10 서열이 5'-AAAG-3'인 경우, 상기 제11 서열은 5'-AACU-3'이고,
- [860] 상기 제10 서열이 5'-AAAGC-3'인 경우, 상기 제11 서열은 5'-GAACU-3'이고,
- [861] 상기 제10 서열이 5'-AAAGCU-3'인 경우, 상기 제11 서열은 5'-AGAACU-3'이고,
- [862] 상기 제10 서열이 5'-AAAGCUG-3'인 경우, 상기 제11 서열은 5'-UAGAACU-3'
 또는 5'-UUAGAACU-3'이고,
- [863] 상기 제10 서열이 5'-AAAGCUGU-3'인 경우, 상기 제11 서열은
 5'-AUUAGAACU-3'이고,
- [864] 상기 제10 서열이 5'-AAAGCUGUC-3'인 경우, 상기 제11 서열은
 5'-GAUUAGAACU-3'(서열번호 54)이고,
- [865] 상기 제10 서열이 5'-AAAGCUGUCC-3'(서열번호 52)인 경우, 상기 제11 서열은
 5'-GGAUUAGAACU-3'(서열번호 55)이고,

- [866] 상기 제10 서열이 5'-AAAGCUGUCCC-3'(서열번호 53)인 경우, 상기 제11 서열은 5'-GGGAUUAGAACU-3'(서열번호 56)이고,
- [867] 상기 제10 서열이 5'-AAAAGCUGUCCC-3'(서열번호 440)인 경우, 상기 제11 서열은 5'-GGGAUUAGAACUU-3'(서열번호 442) 일 수 있다.
- [868] 상기 제10 서열이 5'-CAAAAGCUGUCCC-3'(서열번호 441)인 경우, 상기 제11 서열은 5'-GGGAUUAGAACUUG-3'(서열번호 443) 인 것을 특징으로 하는 엔지니어링 된 가이드 RNA.
- [869] 실시예 11, sgRNA ver.B, v4.0
- [870] 실시예 10에 있어서, 상기 제10 서열은 5'-CAAAAGCUGUCCC-3'(서열번호 441)이고, 상기 제11 서열은 5'-GGGAUUAGAACUUG-3'(서열번호 443)인 것을 특징으로 하는 엔지니어링 된 가이드 RNA.
- [871] 실시예 12, sgRNA ver.B, + 4th&5th region variations
- [872] 실시예 5에 있어서, 상기 엔지니어링 된 스캐폴드 영역의 서열은,
- [873] 5'-U-3', 5'-UU-3', 5'-UUC-3', 5'-UUCA-3', 5'-UUCAU-3', 5'-UUCAUU-3', 및 5'-UUCAUUU-3'로 이루어진 군에서 선택된 제 12서열, 및
- [874] 5'-A-3', 5'-AA-3', 5'-GAA-3', 5'-UGAA-3', 5'-AUGAA-3', 5'-AAUGAA-3', 및 5'-GAAUGAA-3'로 이루어진 군에서 선택된 제 13서열을 추가적으로 포함하며,
- [875] 이때, 상기 제6 서열의 3'말단 및 상기 링커의 5'말단은 상기 제12 서열을 통해 연결되고,
- [876] 상기 링커의 3'말단 및 상기 제7 서열의 5'말단은 상기 제13 서열을 통해 연결되어 있는 것을 특징으로 하는 엔지니어링 된 가이드 RNA.
- [877] 실시예 13, sgRNA ver.B, 4th&5th region examples
- [878] 실시예 12에 있어서,
- [879] 상기 제12 서열이 5'-U-3'인 경우, 상기 제13 서열은 5'-A-3'이고,
- [880] 상기 제12 서열이 5'-UU-3'인 경우, 상기 제13 서열은 5'-AA-3'이고,
- [881] 상기 제12 서열이 5'-UUC-3'인 경우, 상기 제13 서열은 5'-GAA-3'이고,
- [882] 상기 제12 서열이 5'-UUCA-3'인 경우, 상기 제13 서열은 5'-UGAA-3'이고,
- [883] 상기 제12 서열이 5'-UUCAU-3'인 경우, 상기 제13 서열은 5'-AUGAA-3'이고,
- [884] 상기 제12 서열이 5'-UUCAUU-3'인 경우, 상기 제13 서열은 5'-AAUGAA-3'이고,
- [885] 상기 제12 서열이 5'-UUCAUUU-3'인 경우, 상기 제13 서열은 5'-GAAUGAA-3'인 것을 특징으로 하는 엔지니어링 된 가이드 RNA.
- [886] 실시예 14, dual gRNA
- [887] 다음을 포함하는 CRISPR/Cas12f1 시스템을 위한 엔지니어링 된 가이드 RNA:
- [888] 엔지니어링 된 스캐폴드 영역; 및
- [889] 스페이서;
- [890] 이때, 상기 스페이서는 10 내지 50 뉴클레오타이드 길이를 가지며, 표적 서열과 상보적인 서열을 가지며,
- [891] 상기 엔지니어링 된 스캐폴드 영역의 서열은 다음 서열을 포함함:

- [892] 5'말단에서 3'말단 방향으로,
- [893] 5'-A-3', 5'-AA-3', 5'-GAA-3', 5'-AGAA-3', 5'-GAGAA-3', 5'-GGAGAA-3',
 5'-UGGAGAA-3', 5'-GUGGAGAA-3', 5'-AGUGGAGAA-3',
 5'-AAGUGGAGAA-3'(서열번호 16), 5'-AAAGUGGAGAA-3'(서열번호 17),
 5'-UAAAGUGGAGAA-3'(서열번호 18), 5'-AUAAGUGGAGAA-3'(서열번호 19),
 5'-GAUAAAGUGGAGAA-3'(서열번호 20),
 5'-UGAUAAAGUGGAGAA-3'(서열번호 21),
 5'-CUGAUAAAGUGGAGAA-3'(서열번호 22),
 5'-ACUGAUAAAGUGGAGAA-3'(서열번호 23),
 5'-CACUGAUAAAGUGGAGAA-3'(서열번호 24),
 5'-UCACUGAUAAAGUGGAGAA-3'(서열번호 25),
 5'-UUCACUGAUAAAGUGGAGAA-3'(서열번호 26), 및
 5'-CUUCACUGAUAAAGUGGAGAA-3'(서열번호 9)로 이루어진 군에서 선택된 서열,
- [894] 5'-CCGCUUCACUUAGAGUGAAGGUGG-3'(서열번호 430),
 5'-CCGCUUCACCUUAGGAGUGAAGGUGG-3'(서열번호 431),
 5'-CCGCUUCACCAUUAGUGAGUGAAGGUGG-3'(서열번호 38),
 5'-CCGCUUCACCAAUUAGUUGAGUGAAGGUGG-3'(서열번호 39),
 5'-CCGCUUCACCAAAUUAGCUUGAGUGAAGGUGG-3'(서열번호 40),
 5'-CCGCUUCACCAAAAUUAGACUUGAGUGAAGGUGG-3'(서열번호 41),
 5'-CCGCUUCACCAAAAGUUAGAACUUGAGUGAAGGUGG-3'(서열번호 42),
 5'-CCGCUUCACCAAAAGCUUAGGAACUUGAGUGAAGGUGG-3'(서열번호 43),
 5'-CCGCUUCACCAAAAGCUUUAGAGAACUUGAGUGAAGGUGG-3'(서열번호 44),
 5'-CCGCUUCACCAAAAGCUGUUAGUUAGAACUUGAGUGAAGGUGG-3'(서열번호 45),
 5'-CCGCUUCACCAAAAGCUGUUAGUAGAACUUGAGUGAAGGUGG-3'(서열번호 46),
 5'-CCGCUUCACCAAAAGCUGUUUAGAUUAGAACUUGAGUGAAGGUGG-3'(서열번호 47),
 5'-CCGCUUCACCAAAAGCUGUCUUAGGAUUAGAACUUGAGUGAAGGUGG-3'(서열번호 48),
 5'-CCGCUUCACCAAAAGCUGUCCUUAGGGAUUAGAACUUGAGUGAAGGUGG-3'(서열번호 49), 및
 5'-CCGCUUCACCAAAAGCUGUCCCUUAGGGGAUUAGAACUUGAGUGAAGGUGG-3'(서열번호 10)로 이루어진 군에서 선택된 서열,
- [895] 5'-GCUGCUUGCAUCAGCCUAAUGUCGAGAAGUGCUUUCUUCGGAAAGU

- AACCCUCGA-3'(서열번호 11), 및
- [896] 5'-AACAAA-3', 5'-AACAAAU-3', 5'-AACAAAUU-3', 5'-AACAAAUUC-3', 5'-AACAAAUUCA-3'(서열번호 66), 5'-AACAAAUUCAU-3'(서열번호 67), 5'-AACAAAUUCAUU-3'(서열번호 68), 및 5'-AACAAAUUCAUUU-3'(서열번호 12)로 이루어진 군에서 선택된 서열이 연결된 엔지니어링 된 tracrRNA; 및
- [897] 5'-GGA-3', 5'-AGGA-3', 5'-AAGGA-3', 5'-GAAGGA-3', 5'-UGAAGGA-3', 5'-AUGAAGGA-3', 5'-AAUGAAGGA-3', 및 5'-GAAUGAAGGA-3'(서열번호 14)으로 이루어진 군에서 선택된 서열, 및
- [898] 5'-AUGCAAC-3'가 연결된 엔지니어링 된 crRNA 반복 서열 부분,
- [899] 이때, 상기 엔지니어링 된 crRNA 반복 서열 부분의 3'말단은 상기 스페이서의 5'말단과 연결 되어 있으며,
- [900] 상기 엔지니어링 된 tracrRNA의 서열이
5'-CUUCACUGAUAAAGUGGAGAACCGCUUCACCAAAAGCUGUCCCUUAGG
GGAUUAGAACUUGAGUGAAGGUGGGCUGCUUGCAUCAGCCUAAUGUCGA
GAAGUGCUUUCUUCGGAAAGUAACCCUCGAAACAAAUUCAUUU-3'(서열번호 1)과 동일하고, 및 상기 엔지니어링 된 crRNA 반복 서열이
5'-GAAUGAAGGAAUGCAAC-3'(서열번호 3)과 동일한 경우는 제외되는 것을 특징으로 함.
- [901] 실시예 15, complex, ver.A
- [902] 다음을 포함하는, 표적 서열을 포함하는 핵산을 편집할 수 있는 엔지니어링 된 CRISPR/Cas12f1 복합체:
- [903] Cas12f1 단백질; 및
- [904] 엔지니어링 된 가이드 RNA,
- [905] 이때, 상기 엔지니어링 된 가이드 RNA는 다음을 포함함:
- [906] 엔지니어링 된 스캐폴드 영역; 및
- [907] 스페이서;
- [908] 이때, 상기 엔지니어링 된 가이드 RNA는 5'말단에서 3'말단 방향으로, 엔지니어링 된 스캐폴드 영역, 및 스페이서가 순서대로 연결되어 있고,
- [909] 상기 스페이서는 10개 이상 50개 이하의 뉴클레오타이드를 포함하며, 표적 서열과 상보적인 서열을 가지고,
- [910] 상기 엔지니어링 된 스캐폴드 영역의 서열은
5'-CUUCACUGAUAAAGUGGAGAACCGCUUCACCAAAAGCUGUCCCUUAGG
GGAUUAGAACUUGAGUGAAGGUGGGCUGCUUGCAUCAGCCUAAUGUCGA
GAAGUGCUUUCUUCGGAAAGUAACCCUCGAAACAAAUUCAUUUGAAAGA
AUGAAGGAAUGCAAC-3'(서열번호 7)과 상이한 것을 특징으로 하며,
- [911] 상기 엔지니어링 된 스캐폴드 영역의 서열은 5'말단에서 3'말단 방향으로 다음 서열이 순서대로 연결된 것임:
- [912] 5'-A-3', 5'-AA-3', 5'-GAA-3', 5'-AGAA-3', 5'-GAGAA-3', 5'-GGAGAA-3',

5'-UGGAGAA-3', 5'-GUGGAGAA-3', 5'-AGUGGAGAA-3',
 5'-AAGUGGAGAA-3'(서열번호 16), 5'-AAAGUGGAGAA-3'(서열번호 17),
 5'-UAAAGUGGAGAA-3'(서열번호 18), 5'-AUAAGUGGAGAA-3'(서열번호 19),
 5'-GAUAAAGUGGAGAA-3'(서열번호 20),
 5'-UGAUAAAGUGGAGAA-3'(서열번호 21),
 5'-CUGAUAAAGUGGAGAA-3'(서열번호 22),
 5'-ACUGAUAAAGUGGAGAA-3'(서열번호 23),
 5'-CACUGAUAAAGUGGAGAA-3'(서열번호 24),
 5'-UCACUGAUAAAGUGGAGAA-3'(서열번호 25),
 5'-UUCACUGAUAAAGUGGAGAA-3'(서열번호 26), 및
 5'-CUUCACUGAUAAAGUGGAGAA-3'(서열번호 9)로 이루어진 군에서 선택된 서열;

- [913] 5'-CCGCUUCACUAGAGUGAAGGUGG-3'(서열번호 430),
 5'-CCGCUUCACCUAGGAGUGAAGGUGG-3'(서열번호 431),
 5'-CCGCUUCACCAUAGUGAGUGAAGGUGG-3'(서열번호 38),
 5'-CCGCUUCACCAAUAGUUGAGUGAAGGUGG-3'(서열번호 39),
 5'-CCGCUUCACCAAAUAGCUUGAGUGAAGGUGG-3'(서열번호 40),
 5'-CCGCUUCACCAAAAUAGACUUGAGUGAAGGUGG-3'(서열번호 41),
 5'-CCGCUUCACCAAAAGUAGAACUUGAGUGAAGGUGG-3'(서열번호 42),
 5'-CCGCUUCACCAAAAGCUUAGGAACUUGAGUGAAGGUGG-3'(서열번호 43),
 5'-CCGCUUCACCAAAAGCUUAGAGAACUUGAGUGAAGGUGG-3'(서열번호 44),
 5'-CCGCUUCACCAAAAGCUGUAGUAGAACUUGAGUGAAGGUGG-3'(서열번호 45),
 5'-CCGCUUCACCAAAAGCUGUAGUAGAACUUGAGUGAAGGUGG-3'(서열번호 46),
 5'-CCGCUUCACCAAAAGCUGUUAGAUAGAACUUGAGUGAAGGUGG-3'(서열번호 47),
 5'-CCGCUUCACCAAAAGCUGUCUAGGAUAGAACUUGAGUGAAGGUGG-3'(서열번호 48),
 5'-CCGCUUCACCAAAAGCUGUCCUAGGGAUAGAACUUGAGUGAAGGUGG-3'(서열번호 49), 및
 5'-CCGCUUCACCAAAAGCUGUCCCUAGGGGAUAGAACUUGAGUGAAGGUGG-3'(서열번호 10)로 이루어진 군에서 선택된 서열;
- [914] 5'-GCUGCUUGCAUCAGCCUAAUGUCGAGAAGUGCUUUCUUCGGAAAGUAACCCUCGA-3'(서열번호 11);
- [915] 5'-AACAAAGAAAGGA-3'(서열번호 110),

5'-AACAAAUGAAAAGGA-3'(서열번호 111),
 5'-AACAAAUUGAAAAAGGA-3'(서열번호 112),
 5'-AACAAAUUCGAAAGAAGGA-3'(서열번호 113),
 5'-AACAAAUUCAGAAAUGAAGGA-3'(서열번호 114),
 5'-AACAAAUUCAUGAAAAUGAAGGA-3'(서열번호 115),
 5'-AACAAAUUCAUUGAAAAUGAAGGA-3'(서열번호 116), 및
 5'-AACAAAUUCAUUUGAAAGAAUGAAGGA-3'(서열번호 117)에서 선택된
 서열; 및

[916] 5'-AUGCAAC-3'.

[917] 실시예 16, complex, ver.A, v4.0

[918] 제15 항에 있어서, 상기 엔지니어링 된 가이드 RNA에 포함된 상기 스캐폴드 영역의 서열은 5'말단에서 3'말단 방향으로 다음 서열이 순서대로 연결된 것을 특징으로 하는 엔지니어링 된 CRISPR/Cas12f1 복합체:

[919] 5'-A-3';

[920] 5'-CCGCUUCACCAAAAGCUGUCCCUUAGGGGAUUAGAACUUGAGUGAAGGUGG-3'(서열번호 10);

[921] 5'-GCUGCUUGCAUCAGCCUAAUGUCGAGAAGUGCUUUCUUCGGAAAGUAACCCUCGA-3'(서열번호 11);

[922] 5'-AACAAAGAAAGGA-3'(서열번호 110); 및

[923] 5'-AUGCAAC-3'.

[924] 실시예 17, complex, ver.A, v4.1

[925] 제15 항에 있어서, 상기 엔지니어링 된 가이드 RNA에 포함된 상기 스캐폴드 영역의 서열은 5'말단에서 3'말단 방향으로 다음 서열이 순서대로 연결된 것을 특징으로 하는 엔지니어링 된 CRISPR/Cas12f1 복합체:

[926] 5'-A-3';

[927] 5'-CCGCUUCACUUAGAGUGAAGGUGG-3'(서열번호 430);

[928] 5'-GCUGCUUGCAUCAGCCUAAUGUCGAGAAGUGCUUUCUUCGGAAAGUAACCCUCGA-3'(서열번호 11);

[929] 5'-AACAAAGAAAGGA-3'(서열번호 110); 및

[930] 5'-AUGCAAC-3'.

[931] 실시예 18, complex, ver.B

[932] 다음을 포함하는, 표적 서열을 포함하는 핵산을 편집할 수 있는 엔지니어링 된 CRISPR/Cas12f1 복합체:

[933] Cas12f1 단백질; 및

[934] 실시예 5 내지 실시예 13 중 어느 한 항에 따른 엔지니어링 된 가이드 RNA.

[935] 실시예 19, vector, ver.A

[936] 다음을 포함하는, CRISPR/Cas12f1 시스템의 각 구성요소를 발현할 수 있는 벡터:

- [937] Cas12f1 단백질을 암호화하는 핵산 서열을 포함하는 제1 서열;
- [938] 상기 제1 서열과 작동 가능하게 연결된 제1 프로모터 서열;
- [939] 엔지니어링 된 가이드 RNA를 암호화하는 핵산 서열을 포함하는 제2 서열; 및
- [940] 상기 제2 서열과 작동 가능하게 연결된 제2 프로모터 서열,
- [941] 이때, 상기 엔지니어링 된 가이드 RNA는 다음을 포함함:
- [942] 엔지니어링 된 스캐폴드 영역; 및
- [943] 스페이서;
- [944] 이때, 상기 엔지니어링 된 가이드 RNA는 5'말단에서 3'말단 방향으로, 엔지니어링 된 스캐폴드 영역, 및 스페이서가 순서대로 연결되어 있고,
- [945] 상기 스페이서는 10개 이상 50개 이하의 뉴클레오타이드를 포함하며, 표적 서열과 상보적인 서열을 가지고,
- [946] 상기 엔지니어링 된 스캐폴드 영역의 서열은
 5'-CUUCACUGAUAAGUGGAGAACCGCUUCACCAAAAGCUGUCCCUUAGG
 GGAUUAGAACUUGAGUGAAGGUGGGCUGCUUGCAUCAGCCUAAUGUCGA
 GAAGUGCUUUCUUCGGAAAGUAACCCUCGAAACAAAUUCAUUUGAAAGA
 AUGAAGGAAUGCAAC-3'(서열번호 7)과 상이한 것을 특징으로 하며,
- [947] 상기 엔지니어링 된 스캐폴드 영역의 서열은 5'말단에서 3'말단 방향으로 다음 서열이 순서대로 연결된 것임:
- [948] 5'-A-3', 5'-AA-3', 5'-GAA-3', 5'-AGAA-3', 5'-GAGAA-3', 5'-GGAGAA-3',
 5'-UGGAGAA-3', 5'-GUGGAGAA-3', 5'-AGUGGAGAA-3',
 5'-AAGUGGAGAA-3'(서열번호 16), 5'-AAAGUGGAGAA-3'(서열번호 17),
 5'-UAAAGUGGAGAA-3'(서열번호 18), 5'-AUAAAGUGGAGAA-3'(서열번호 19),
 5'-GAUAAAGUGGAGAA-3'(서열번호 20),
 5'-UGAUAAAGUGGAGAA-3'(서열번호 21),
 5'-CUGAUAAAGUGGAGAA-3'(서열번호 22),
 5'-ACUGAUAAAGUGGAGAA-3'(서열번호 23),
 5'-CACUGAUAAAGUGGAGAA-3'(서열번호 24),
 5'-UCACUGAUAAAGUGGAGAA-3'(서열번호 25),
 5'-UUCACUGAUAAAGUGGAGAA-3'(서열번호 26), 및
 5'-CUUCACUGAUAAGUGGAGAA-3'(서열번호 9)로 이루어진 군에서 선택된 서열;
- [949] 5'-CCGCUUCACUAGAGUGAAGGUGG-3'(서열번호 430),
 5'-CCGCUUCACCUAGGAGUGAAGGUGG-3'(서열번호 431),
 5'-CCGCUUCACCAUAGUGAGUGAAGGUGG-3'(서열번호 38),
 5'-CCGCUUCACCAAUAGUUGAGUGAAGGUGG-3'(서열번호 39),
 5'-CCGCUUCACCAAAUAGCUUGAGUGAAGGUGG-3'(서열번호 40),
 5'-CCGCUUCACCAAAAUAGACUUGAGUGAAGGUGG-3'(서열번호 41),
 5'-CCGCUUCACCAAAAGUUAGAACUUGAGUGAAGGUGG-3'(서열번호 42),

- 5'-CCGCUUCACCAAAAAGCUUAGGAACUUGAGUGAAGGUGG-3'(서열번호 43),
 5'-CCGCUUCACCAAAAAGCUUUAGAGAACUUGAGUGAAGGUGG-3'(서열번호 44),
 5'-CCGCUUCACCAAAAAGCUGUUAGUUAGAACUUGAGUGAAGGUGG-3'(서열번호 45),
 5'-CCGCUUCACCAAAAAGCUGUUAGUAGAACUUGAGUGAAGGUGG-3'(서열번호 46),
 5'-CCGCUUCACCAAAAAGCUGUUUAGAUUAGAACUUGAGUGAAGGUGG-3'(서열번호 47),
 5'-CCGCUUCACCAAAAAGCUGUCUUAGGAUUAGAACUUGAGUGAAGGUGG-3'(서열번호 48),
 5'-CCGCUUCACCAAAAAGCUGUCCUUAGGGAUUAGAACUUGAGUGAAGGUGG-3'(서열번호 49), 및
 5'-CCGCUUCACCAAAAAGCUGUCCCUUAGGGGAUUAGAACUUGAGUGAAGGUGG-3'(서열번호 10)로 이루어진 군에서 선택된 서열;
- [950] 5'-GCUGCUUGCAUCAGCCUAAUGUCGAGAAGUGCUUUCUUCGGAAAGUAACCCUCGA-3'(서열번호 11);
- [951] 5'-AACAAAGAAAGGA-3'(서열번호 110),
 5'-AACAAAUGAAAAGGA-3'(서열번호 111),
 5'-AACAAAUUGAAAAAGGA-3'(서열번호 112),
 5'-AACAAAUUCGAAAGAAGGA-3'(서열번호 113),
 5'-AACAAAUUCAGAAAUGAAGGA-3'(서열번호 114),
 5'-AACAAAUUCAUGAAAAUGAAGGA-3'(서열번호 115),
 5'-AACAAAUUCAUUGAAAAAUGAAGGA-3'(서열번호 116), 및
 5'-AACAAAUUCAUUUGAAAGAAUGAAGGA-3'(서열번호 117)에서 선택된 서열; 및
- [952] 5'-AUGCAAC-3'.
- [953] 실시예 20, vector, ver.A, v4.0
- [954] 실시예 19에 있어서, 상기 엔지니어링 된 가이드 RNA에 포함된 상기 스캐폴드 영역의 서열은 5'말단에서 3'말단 방향으로 다음 서열이 순서대로 연결된 것을 특징으로 하는 벡터:
- [955] 5'-A-3';
- [956] 5'-CCGCUUCACCAAAAAGCUGUCCCUUAGGGGAUUAGAACUUGAGUGAAGGUGG-3'(서열번호 10);
- [957] 5'-GCUGCUUGCAUCAGCCUAAUGUCGAGAAGUGCUUUCUUCGGAAAGUAACCCUCGA-3'(서열번호 11);
- [958] 5'-AACAAAGAAAGGA-3'(서열번호 110); 및

- [959] 5'-AUGCAAC-3'.
- [960] 실시예 21, vector, ver.A, v4.1
- [961] 실시예 19에 있어서, 상기 엔지니어링 된 가이드 RNA에 포함된 상기 스캐폴드 영역의 서열은 5'말단에서 3'말단 방향으로 다음 서열이 순서대로 연결된 것을 특징으로 하는 벡터:
- [962] 5'-A-3';
- [963] 5'-CCGCUUCACUUAGAGUGAAGGUGG-3'(서열번호 430);
- [964] 5'-GCUGCUUGCAUCAGCCUAAUGUCGAGAAGUGCUUUCUUCGGAAGU AACCCUCGA-3'(서열번호 11);
- [965] 5'-AACAAAGAAAGGA-3'(서열번호 110); 및
- [966] 5'-AUGCAAC-3'.
- [967] 실시예 22, vector, ver.A, viral or plasmid
- [968] 실시예 19에 있어서, 상기 벡터는 플라스미드, 레트로바이러스, 렌티바이러스, 아데노바이러스, 아데노-연관 바이러스, 백시니아바이러스, 폭스바이러스 및 단순포진 바이러스로 구성된 군에서 선택되는 하나 이상인 것을 특징으로 하는 벡터.
- [969] 실시예 23, vector, ver.B
- [970] 다음을 포함하는, CRISPR/Cas12f1 시스템의 각 구성요소를 발현할 수 있는 벡터:
- [971] Cas12f1 단백질을 암호화하는 핵산 서열을 포함하는 제1 서열;
- [972] 상기 제1 서열과 작동 가능하게 연결된 제1 프로모터 서열;
- [973] 실시예 5 내지 실시예 13 중 어느 한 항에 따른 엔지니어링 된 가이드 RNA를 암호화하는 핵산 서열을 포함하는 제2 서열; 및
- [974] 상기 제2 서열과 작동 가능하게 연결된 제2 프로모터 서열.
- [975] 실시예 24, editing method, ver.A, MF
- [976] 다음을 포함하는, 세포 내에서 표적 서열을 포함하는 핵산을 편집하는 방법:
- [977] Cas12f1 단백질 또는 이를 암호화하는 핵산, 및 엔지니어링 된 가이드 RNA 또는 이를 암호화하는 핵산을 세포 내로 전달하는 것,
- [978] 이로 인해 상기 세포 내에서 CRISPR/Cas12f1 복합체가 형성될 수 있으며,
- [979] 이로 인해 상기 표적 서열을 포함하는 핵산이 CRISPR/Cas12f1 복합체에 의해 편집될 수 있고,
- [980] 상기 엔지니어링 된 가이드 RNA는 다음을 포함하는 것을 특징으로 함:
- [981] 엔지니어링 된 스캐폴드 영역; 및
- [982] 스페이서;
- [983] 이때, 상기 엔지니어링 된 가이드 RNA는 5'말단에서 3'말단 방향으로, 엔지니어링 된 스캐폴드 영역, 및 스페이서가 순서대로 연결되어 있고,
- [984] 상기 스페이서는 10개 이상 50개 이하의 뉴클레오타이드를 포함하며, 표적 서열과 상보적인 서열을 가지고,

- [985] 상기 엔지니어링 된 스캐폴드 영역의 서열은
 5'-CUUCACUGAUAAAGUGGAGAACCGCUUCACCAAAAGCUGUCCCUUAGG
 GGAUUAGAACUUGAGUGAAGGUGGGCUGCUUGCAUCAGCCUAAUGUCGA
 GAAGUGCUUUCUUCGGAAAGUAACCCUCGAAACAAAUUCAUUUGAAAGA
 AUGAAGGAAUGCAAC-3'(서열번호 7)과 상이한 것을 특징으로 하며,
- [986] 상기 엔지니어링 된 스캐폴드 영역의 서열은 5'말단에서 3'말단 방향으로 다음
 서열이 순서대로 연결된 것임:
- [987] 5'-A-3', 5'-AA-3', 5'-GAA-3', 5'-AGAA-3', 5'-GAGAA-3', 5'-GGAGAA-3',
 5'-UGGAGAA-3', 5'-GUGGAGAA-3', 5'-AGUGGAGAA-3',
 5'-AAGUGGAGAA-3'(서열번호 16), 5'-AAAGUGGAGAA-3'(서열번호 17),
 5'-UAAAGUGGAGAA-3'(서열번호 18), 5'-AUAAGUGGAGAA-3'(서열번호 19),
 5'-GAUAAAGUGGAGAA-3'(서열번호 20),
 5'-UGAUAAAGUGGAGAA-3'(서열번호 21),
 5'-CUGAUAAAGUGGAGAA-3'(서열번호 22),
 5'-ACUGAUAAAGUGGAGAA-3'(서열번호 23),
 5'-CACUGAUAAAGUGGAGAA-3'(서열번호 24),
 5'-UCACUGAUAAAGUGGAGAA-3'(서열번호 25),
 5'-UUCACUGAUAAAGUGGAGAA-3'(서열번호 26), 및
 5'-CUUCACUGAUAAAGUGGAGAA-3'(서열번호 9)로 이루어진 군에서 선택된
 서열;
- [988] 5'-CCGCUUCACUAGAGUGAAGGUGG-3'(서열번호 430),
 5'-CCGCUUCACCUAGGAGUGAAGGUGG-3'(서열번호 431),
 5'-CCGCUUCACCAUAGUGAGUGAAGGUGG-3'(서열번호 38),
 5'-CCGCUUCACCAAUAGUUGAGUGAAGGUGG-3'(서열번호 39),
 5'-CCGCUUCACCAAAUAGCUUGAGUGAAGGUGG-3'(서열번호 40),
 5'-CCGCUUCACCAAAAUAGACUUGAGUGAAGGUGG-3'(서열번호 41),
 5'-CCGCUUCACCAAAAGUUAGAACUUGAGUGAAGGUGG-3'(서열번호 42),
 5'-CCGCUUCACCAAAAGCUUAGGAACUUGAGUGAAGGUGG-3'(서열번호
 43),
 5'-CCGCUUCACCAAAAGCUUUAGAGAACUUGAGUGAAGGUGG-3'(서열번호
 44),
 5'-CCGCUUCACCAAAAGCUGUUAGUUAGAACUUGAGUGAAGGUGG-3'(서열
 번호 45),
 5'-CCGCUUCACCAAAAGCUGUUAGUAGAACUUGAGUGAAGGUGG-3'(서열
 번호 46),
 5'-CCGCUUCACCAAAAGCUGUUUAGAUUAGAACUUGAGUGAAGGUGG-3'(서열
 번호 47),
 5'-CCGCUUCACCAAAAGCUGUCUUAGGAUUAGAACUUGAGUGAAGGUGG-

- 3'(서열번호 48),
 5'-CCGCUUCACCAAAAGCUGUCCUUAGGGAUUAGAACUUGAGUGAAGGUGG-3'(서열번호 49), 및
 5'-CCGCUUCACCAAAAGCUGUCCCUUAGGGGAUUAGAACUUGAGUGAAGGUGG-3'(서열번호 10)로 이루어진 군에서 선택된 서열;
- [989] 5'-GCUGCUUGCAUCAGCCUAAUGUCGAGAAGUGCUUUCUUCGGAAAGUAACCCUCGA-3'(서열번호 11);
- [990] 5'-AACAAAGAAAGGA-3'(서열번호 110),
 5'-AACAAAUGAAAAGGA-3'(서열번호 111),
 5'-AACAAAUUGAAAAAGGA-3'(서열번호 112),
 5'-AACAAAUUCGAAAGAAGGA-3'(서열번호 113),
 5'-AACAAAUUCAGAAAUGAAGGA-3'(서열번호 114),
 5'-AACAAAUUCAUGAAAAUGAAGGA-3'(서열번호 115),
 5'-AACAAAUUCAUUGAAAAUGAAGGA-3'(서열번호 116), 및
 5'-AACAAAUUCAUUUGAAAGAAUGAAGGA-3'(서열번호 117)에서 선택된 서열; 및
- [991] 5'-AUGCAAC-3'.
- [992] 실시예 25, editing method, ver.A, WT
- [993] 다음을 포함하는, 세포 내에서 표적 서열을 포함하는 핵산을 편집하는 방법:
- [994] Cas12f1 단백질 또는 이를 암호화하는 핵산, 및 엔지니어링 된 가이드 RNA 또는 이를 암호화하는 핵산을 세포 내로 전달하는 것,
- [995] 이로 인해 상기 세포 내에서 CRISPR/Cas12f1 복합체가 형성될 수 있으며,
- [996] 이로 인해 상기 표적 서열을 포함하는 핵산이 CRISPR/Cas12f1 복합체에 의해 편집될 수 있고,
- [997] 상기 엔지니어링 된 가이드 RNA는 다음을 포함하는 것을 특징으로 함:
- [998] 엔지니어링 된 스캐폴드 영역; 및
- [999] 스페이서; 및
- [1000] 이때, 상기 엔지니어링 된 가이드 RNA는 5'말단에서 3'말단 방향으로, 엔지니어링 된 스캐폴드 영역, 및 스페이서가 순서대로 연결되어 있고,
- [1001] 상기 스페이서는 10개 이상 50개 이하의 뉴클레오타이드를 포함하며, 표적 서열과 상보적인 서열을 가지고,
- [1002] 상기 엔지니어링 된 스캐폴드 영역의 서열은
 5'-CUUCACUGAUAAAGUGGAGAACCGCUUCACCAAAAGCUGUCCCUUAGGGAUUAGAACUUGAGUGAAGGUGGGCUGCUUGCAUCAGCCUAAUGUCGAAGUGCUUUCUUCGGAAAGUAACCCUCGAAACAAAUUCAUUUUUCCUCUCCAAUUCUGCACAAGAAAGUUGCAGAACCCGAAUAGACGAAUGAAGGAUGCAAC-3'(서열번호 315)과 상이한 것을 특징으로 하며,
- [1003] 상기 엔지니어링 된 스캐폴드 영역의 서열은 5'말단에서 3'말단 방향으로 다음

서열이 순서대로 연결된 것임:

- [1004] 5'-A-3', 5'-AA-3', 5'-GAA-3', 5'-AGAA-3', 5'-GAGAA-3', 5'-GGAGAA-3',
5'-UGGAGAA-3', 5'-GUGGAGAA-3', 5'-AGUGGAGAA-3',
5'-AAGUGGAGAA-3'(서열번호 16), 5'-AAAGUGGAGAA-3'(서열번호 17),
5'-UAAAGUGGAGAA-3'(서열번호 18), 5'-AUAAGUGGAGAA-3'(서열번호 19),
5'-GAUAAAGUGGAGAA-3'(서열번호 20),
5'-UGAUAAAGUGGAGAA-3'(서열번호 21),
5'-CUGAUAAAGUGGAGAA-3'(서열번호 22),
5'-ACUGAUAAAGUGGAGAA-3'(서열번호 23),
5'-CACUGAUAAAGUGGAGAA-3'(서열번호 24),
5'-UCACUGAUAAAGUGGAGAA-3'(서열번호 25),
5'-UUCACUGAUAAAGUGGAGAA-3'(서열번호 26), 및
5'-CUUCACUGAUAAAGUGGAGAA-3'(서열번호 9)로 이루어진 군에서 선택된
서열;
- [1005] 5'-CCGCUUCACUUAGAGUGAAGGUGG-3'(서열번호 430),
5'-CCGCUUCACCUUAGGAGUGAAGGUGG-3'(서열번호 431),
5'-CCGCUUCACCAUUAGUGAGUGAAGGUGG-3'(서열번호 38),
5'-CCGCUUCACCAAUUAGUUGAGUGAAGGUGG-3'(서열번호 39),
5'-CCGCUUCACCAAAUUAGCUUGAGUGAAGGUGG-3'(서열번호 40),
5'-CCGCUUCACCAAAAUUAGACUUGAGUGAAGGUGG-3'(서열번호 41),
5'-CCGCUUCACCAAAAGUUAGAACUUGAGUGAAGGUGG-3'(서열번호 42),
5'-CCGCUUCACCAAAAGCUUAGGAACUUGAGUGAAGGUGG-3'(서열번호
43),
5'-CCGCUUCACCAAAAGCUUUAGAGAACUUGAGUGAAGGUGG-3'(서열번호
44),
5'-CCGCUUCACCAAAAGCUGUUAGUUGAAGCUUGAGUGAAGGUGG-3'(서열
번호 45),
5'-CCGCUUCACCAAAAGCUGUUAGUAGAACUUGAGUGAAGGUGG-3'(서열
번호 46),
5'-CCGCUUCACCAAAAGCUGUUUAGAUUAGAACUUGAGUGAAGGUGG-3'(서열
번호 47),
5'-CCGCUUCACCAAAAGCUGUCUUAGGAUUAGAACUUGAGUGAAGGUGG-
3'(서열번호 48),
5'-CCGCUUCACCAAAAGCUGUCCUUAGGGAUUAGAACUUGAGUGAAGGU
GG-3'(서열번호 49), 및
5'-CCGCUUCACCAAAAGCUGUCCCUUAGGGGAUUAGAACUUGAGUGAAG
GUGG-3'(서열번호 10)로 이루어진 군에서 선택된 서열;
- [1006] 5'-GCUGCUUGCAUCAGCCUAAUGUCGAGAAGUGCUUUCUUCGGAAAGU

- AACCCUCGA-3'(서열번호 11);
- [1007] 5'-AACAAAGAAAGGA-3'(서열번호 110),
 5'-AACAAAUGAAAAGGA-3'(서열번호 111),
 5'-AACAAAUUGAAAAAGGA-3'(서열번호 112),
 5'-AACAAAUUCGAAAGAAGGA-3'(서열번호 113),
 5'-AACAAAUUCAGAAAUUGAAGGA-3'(서열번호 114),
 5'-AACAAAUUCAUGAAAAUGAAGGA-3'(서열번호 115),
 5'-AACAAAUUCAUUGAAAAAUGAAGGA-3'(서열번호 116),
 5'-AACAAAUUCAUUUGAAAGAAUGAAGGA-3'(서열번호 117),
 5'-AACAAAUUCAUUUUGAAACGAAUGAAGGA-3'(서열번호 293),
 5'-AACAAAUUCAUUUUUGAAAACGAAUGAAGGA-3'(서열번호 294),
 5'-AACAAAUUCAUUUUUCGAAAGACGAAUGAAGGA-3'(서열번호 295),
 5'-AACAAAUUCAUUUUUCCGAAAAGACGAAUGAAGGA-3'(서열번호 296),
 5'-AACAAAUUCAUUUUUCCUGAAAUAGACGAAUGAAGGA-3'(서열번호 297),
 5'-AACAAAUUCAUUUUUCCUCGAAAUAGACGAAUGAAGGA-3'(서열번호 298),
 5'-AACAAAUUCAUUUUUCCUCUGAAAAUAGACGAAUGAAGGA-3'(서열번호 299),
 5'-AACAAAUUCAUUUUUCCUCUCGAAAGAAUAGACGAAUGAAGGA-3'(서열번호 300),
 5'-AACAAAUUCAUUUUUCCUCUCCGAAACGAAUAGACGAAUGAAGGA-3'(서열번호 301),
 5'-AACAAAUUCAUUUUUCCUCUCCAGAAACCGAAUAGACGAAUGAAGGA-3'(서열번호 302),
 5'-AACAAAUUCAUUUUUCCUCUCCAAGAAACCCGAAUAGACGAAUGAAGGA-3'(서열번호 303),
 5'-AACAAAUUCAUUUUUCCUCUCCAUGAAAACCCGAAUAGACGAAUGAAGGA-3'(서열번호 304),
 5'-AACAAAUUCAUUUUUCCUCUCCAUAUGAAAACCCGAAUAGACGAAUGAAGGA-3'(서열번호 305),
 5'-AACAAAUUCAUUUUUCCUCUCCAUAUCGAAAGAACCCGAAUAGACGAAUGAAGGA-3'(서열번호 306),
 5'-AACAAAUUCAUUUUUCCUCUCCAUAUCUGAAAAGAACCCGAAUAGACGAAUGAAGGA-3'(서열번호 307),
 5'-AACAAAUUCAUUUUUCCUCUCCAUAUCUGGAAACAGAACCCGAAUAGACGAAUGAAGGA-3'(서열번호 308),
 5'-AACAAAUUCAUUUUUCCUCUCCAUAUCUGCGAAAGCAGAACCCGAAUA

GACGAAUGAAGGA-3'(서열번호 309),
 5'-AACAAAUUCAUUUUCCUCUCCAAUUCUGCAGAAAUGCAGAACCCGAA
 UAGACGAAUGAAGGA-3'(서열번호 310),
 5'-AACAAAUUCAUUUUCCUCUCCAAUUCUGCACGAAAUUGCAGAACCCG
 AAUAGACGAAUGAAGGA-3'(서열번호 311),
 5'-AACAAAUUCAUUUUCCUCUCCAAUUCUGCACAGAAAGUUGCAGAACCC
 CGAAUAGACGAAUGAAGGA-3'(서열번호 312),
 5'-AACAAAUUCAUUUUCCUCUCCAAUUCUGCACAGAAAUUGCAGAACCC
 GAAUAGACGAAUGAAGGA-3'(서열번호 313), 및
 5'-AACAAAUUCAUUUUCCUCUCCAAUUCUGCACAAGAAAGUUGCAGAAC
 CCGAAUAGACGAAUGAAGGA-3'(서열번호 314)로 이루어진 군에서 선택된
 서열; 및

[1008] 5'-AUGCAAC-3'.

[1009] 실시예 26, editing method, ver.A, introducing RNP

[1010] 실시예 24 또는 실시예 25 중 어느 한 항에 있어서, 상기 전달은 상기 Cas12f1 단백질 및 상기 엔지니어링 된 가이드 RNA를 CRISPR/Cas12f1 복합체로써 세포 내에 주입하는 것인 방법.

[1011] 실시예 27, editing method, ver.A, introducing vector

[1012] 실시예 24에 있어서, 상기 전달은 상기 Cas12f1 단백질을 암호화하는 핵산 및 상기 엔지니어링 된 가이드 RNA를 암호화하는 핵산을 포함하는 벡터를 세포 내에 주입하는 것인 방법.

[1013] 실시예 28, editing method, ver.A, editing eukaryotic cell

[1014] 실시예 24 또는 실시예 25 중 어느 한 항에 있어서, 상기 세포는 진핵세포인 것을 특징으로 하는 방법.

[1015] 실시예 29, editing method, ver.A, vector limitation

[1016] 실시예 27에 있어서, 상기 벡터는 플라스미드, 레트로바이러스, 렌티바이러스, 아데노바이러스, 아데노-연관 바이러스, 백시니아바이러스, 폭스바이러스 및 단순포진 바이러스로 구성된 군에서 선택되는 하나 이상인 것을 특징으로 하는 벡터.

[1017] 실시예 30, editing method, ver.B

[1018] 다음을 포함하는, 세포 내에서 표적 서열을 포함하는 핵산을 편집하는 방법:

[1019] Cas12f1 단백질 또는 이를 암호화하는 핵산, 및 실시예 5 내지 실시예 13 중 어느 한 항에 따른 엔지니어링 된 가이드 RNA 또는 이를 암호화하는 핵산을 세포 내로 전달하는 것,

[1020] 이로 인해 상기 세포 내에서 CRISPR/Cas12f1 복합체가 형성될 수 있으며,

[1021] 이로 인해 상기 표적 서열을 포함하는 핵산이 CRISPR/Cas12f1 복합체에 의해 편집될 수 있음.

[1022] 실시예 31, sgRNA, ver.A, DNA

- [1023] 실시예 1 또는 실시예 2 중 어느 한 항의 엔지니어링 된 가이드 RNA를 암호화하는 DNA.
- [1024] 실시예 32, sgRNA, ver.B, DNA
- [1025] 실시예 5 내지 실시예 13 중 어느 한 항의 엔지니어링 된 가이드 RNA를 암호화하는 DNA.
- [1026] 실시예 33, dual guide RNA, DNA
- [1027] 실시예 14의 엔지니어링 된 가이드 RNA를 암호화하는 DNA.
- [1028]

발명의 실시를 위한 형태

- [1029] 이하, 실험에 및 실시예를 통해 본 명세서가 제공하는 발명에 대해 더욱 상세히 설명한다. 이들 실시예는 오로지 본 명세서에 의해 개시되는 내용을 예시하기 위한 것으로, 본 명세서에 의해 개시되는 내용의 범위가 이들 실시예에 의해 제한되는 것으로 해석되지 않는 것은 당업계에서 통상의 지식을 가진 자에게 있어서 자명할 것이다.
- [1030]
- [1031] 실험예 1 실험 재료 준비
- [1032] 실험예 1.1 플라스미드 벡터 설계 및 제조
- [1033] 인간 세포에서 발현하기 위해, Cas12f1 유전자를 코돈-최적화 시켰으며, 상기 최적화된 서열이 벡터 제조를 위해 합성되었다. 최종적으로 Cas12f1 단백질을 암호화하는 서열에는 chicken β -actin 프로모터, 5'- 및 3'-말단의 핵 위치 신호 서열(nuclear localization signal sequence), 자가 절단 T2A 펩타이드로 연결된 eGFP를 인코딩하는 서열이 포함되었다. 상기 Cas12f1 단백질의 아미노산 서열 및 이를 암호화하는 DNA 서열을 [표01]에 나타냈다.
- [1034] [표01]
- [1035]

Label	Sequence (N-terminal to C-terminal/5' to 3')	SEQ ID NO
Cas12f1 + NLS(N/C-terminal) sequence (peptide)	MPKKRKRVAKNTITKTLKLRVPRPYNSEAEKIVADEKNNREKIALEKNKDKVKEACSKHLKVAAYCTTQVERNA CLFCKARKLDDKFYQKLRGQFPDAVFWQEISEIFRQLQKQA AEIYNQSLIELYEIFIKGKIGANASSVEHYLSVVCYTRAAELFKNAIAISGLRSKISNFRLEKELNMMKSLPTTKSDNFIPLVQKGGQYTGFEISNHNSDFIKIPFGRWQVKKEI DKYRPWEKFDQEQVQSPKPIISLLSTRRRKRNKGWSKDEGTEAEIKVMNGDYQTSYIEVKRSGKIGESAWMLNLSIDVPKIDKGVDPSIIGGIDVGKPLVCAINNAFSRYSI SDNDLFHFKKMFARRRILLKKNRHKRAGHGAKNKLKPTITLTKSERFRKLIJRWACEIADFIKKNVGTVMENLESIMRKEDSYFNIRLGRFWPYAEMQNKIEFKLQYGI IRKVPANNTSKTCSKCGHLNNYFNFEYRKNKFPFKCEKCNFKENADYNAALNINSPKLKSTKEPPKKRKRV	262
Cas12f1 + NLS(N/C-terminal) sequence (DNA)	ATGccaaagaagcgaagtcGCCAAGAACACAAATTACAAAGACACTGAAGCTGAGGATCGTGAGACCATACACAGCGCTGAGGTCGAGAAGATTGTGGCTGATGAAA AGAACAAACAGGGAAGAGATCGCCCTCGAGAAAGCAAGGATAAGGTGAAGGAGGCGCTGCTTAAGCACTGAAAGTGGCCGCTACTGCAACACAGGTGGAGG AAGCGCTGCTGTGTTTGTAAAGCTCGGAAGCTGGATGATAAGTTTACCAAGAGCTGCGGGGCCAGTCCCGATGCCGTCTTTGGCAGGAGATTACGAGATCTTCAGA CAGCTGCAGAAAGCGCCGCGAGATCTCAACACAGAGCGCTTCGAGCTCTACTACGAGATCTTCAACAGGGCAAGGCGATTGCCAACGCTCTCTCGTGAGCACTA CCTGAGCGAGCTGTGCTACACAGAGCGCGGAGCTCTTAAGAACCGCGCTATCGCTTCGCGGTGAGGAGCAAGATTAAAGATTAAGTTCGCTCAAGGAGCTGAAG AACATGAAGAGCGCGCTGCCCACTACAAAGAGCGACAACTCCCAATTCCAGTGGTGAAGCAGAGGGGGGCCAGTACACAGGTTGCGAGATTTCACACCAACACAGC GACTTTATTAAGATCCCTTTGGCAGGTGGCAGGTCAAGAAAGGAGATTGACAAAGTACAGGCCCTGGGAGAAGTTTGATTTCGAGCAGGTGCAAGAGAGCCCAAGC CTATTTCCTGCTGCTGCCACACAGCGCGGAGAGGAACAAAGGGGTGGTCTAAGGATGAGGGGACGAGGCCGAGATTAAAGAAAGTATGAACGCGGACTACCAG ACAAGCTACATCGAGGTCAAGCGGGGCAAGTATGGCGAGAAAGCGCCCTGGATGCTGAACCTGAGCATTCGCTGCCAAAGATTGATAAGGGCGTGGATCCACG ATCATCGGAGGGATCGATGTGGGGTCAAGAGCGCCCTCGTGTGCGCATCAACAACGCTTCAGCAGGTAACAGCATCTCCGATAACGACCTGTTCCTTTTAAACAGAA GATGTTTCGCGCGGAGGATTTTGTCTCAAGAAAGAACCGGCACAAAGCGGGGCCAGACAGGGGCCAAGAACAGCTCAAGCCCACTACTCTCCTGAGAGAGAGCGA GAGGTTGAGGAAGAGCTCATCGAGAGATGGGCTCGGAGATCGCGGATTTCTTTATTAAGAACAGGTCGGAACATGTCAGATGGAGAACCTCGAGAGCATGAAGAG GAAGGAGGATTCCTACTCAACTTCGCTGAGGGGGTCTGCGCCCTACGCTGAGATGACAGAACAGGATTGAGTTAAGCTGAAGCAGTACGGGATTGAGATCCGGAAG GTGGCCCCAACACAGCAAGACTCGAGCAAGTGGCGGCACCTCAACACTACTTCACTTCAGATGACCGGAAGAGAACAGATCCCACTTCAAGTGCAGAGA AGTGCAACTTTAAGGAGAACCGCGGATTACACCGCCCTGAACATCAGCAACCTAAGCTGAAGAGCACTAAGGAGGAGCCcaagaagaagcgaagtc	272

- [1036] (엔지니어링 된) Cas12f1 가이드 RNA를 암호화하는 주형 DNA가 합성되었고, pTwist Amp plasmid vector (Twist Bioscience)에 클로닝되었다. 필요한 경우, 상기 벡터는 U6-상보적 forward primer 및 protospacer-상보적 reverse primer를 사용하여, 상기 가이드 RNA 암호화 서열의 증폭을 위한 주형으로 사용되었다. Gibson assembly를 사용하여, 상기 코돈-최적화 된 Cas12f1 유전자를 포함하는

벡터에 엔지니어링 된 Cas12f1 가이드 RNA를 암호화하는 올리고뉴클레오타이드를 클로닝함으로써, 엔지니어링 된 CRISPR/Cas12f1 시스템에 대한 벡터를 제조하였다.

[1037] 실험예 1.2 Cas12f1 가이드 RNA 엔지니어링

[1038] 상기 엔지니어링 된 Cas12f1 가이드 RNA의 엔지니어링 된 스캐폴드 영역 중 제2 영역, 제4 영역 및 제5 영역의 변형은 ApoI 및 BamHI 제한 효소를 사용하여 선형화된 가이드 RNA-암호화 벡터에 변형된 서열 (Macrogen)을 전달하는 합성 올리고뉴클레오타이드를 클로닝하여 수행되었다. 상기 엔지니어링 된 Cas12f1 가이드 RNA의 엔지니어링 된 스캐폴드 영역 중 제1 영역의 변형은, tracrRNA의 5'말단 부분을 표적으로 하는 forward primer 및 U6 프로모터 영역을 표적으로 하는 reverse primer를 사용하여 캐노니컬(canonical), 또는 엔지니어링 된 주형 플라스미드 벡터의 PCR 증폭에 의해 수행되었다. 상기 PCR 증폭은 Q5 Hot Start high-fidelity DNA polymerase (NEB)에 의해 수행되었으며, PCR 산물은 KLD Enzyme Mix (NEB)를 사용하여 결합되었다(ligated). 상기 결합된(ligated) PCR 산물은 DH5α E.coli 세포로 형질도입(transformed)되었다. Sanger 시퀀싱 분석에 의해 Mutagenesis가 확인되었다. 변형된 플라스미드 벡터는 NucleoBond® Xtra Midi EF kit (MN)를 사용하여 정제되었다. 정제된 플라스미드 1 마이크로그램이 T7 RNA polymerase (NEB) 및 NTPs (Jena Bioscience)를 사용한 mRNA 합성의 주형으로 사용되었다. 상기 제조된 엔지니어링 된 Cas12f1 가이드 RNA를 Monarch® RNA cleanup kit (NEB)를 사용하여 정제하고, 극저온 바이알(cryogenic vials)에 분취하여 액체 질소에 보관하였다.

[1039] 실험예 1.3 세포 배양 및 형질도입(transfection)

[1040] HEK293 T 세포(LentX-293T, Takara)가 10%의 열-불활성화 된 fetal bovine serum (FBS) 혈청(Corning) 및 페니실린/스트렙토마이신이 보충된 Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) 배지에서, 5% CO₂ 조건 하 배양되었다. 세포 형질주입은 전기천공법(electroporation) 또는 lipofection으로 수행되었다. 전기천공법의 경우, 실험예 1.2 에서 제조된 Cas12f1 단백질을 암호화하는 플라스미드 벡터 및 가이드 RNA(및 엔지니어링 된 가이드 RNA)를 암호화하는 DNA 각 2-5 µg을 Neon transfection system (Invitrogen)을 사용해 4X10⁵ HEK-293 T세포에 형질주입(transfection) 하였다. 상기 전기천공법은 1300V, 10 mA, 3 pulse 조건 하 수행하였다. lipofection을 위해, 6-15 µL FuGene 시약을 (Promega) 2-5 µg의 Cas12f1 단백질을 암호화하는 플라스미드 벡터 및 1.5-5 µg의 PCR 앰플리콘과 15분동안 혼합하였다. 상기 혼합물(300 µL)이 형질주입 1일 전에 1X10⁶개의 세포가 플레이팅 된 1.5 ml DMEM 배지에 첨가되었다. 상기 세포들을 상기 혼합물의 존재 하 1 내지 10일 간 배양시켰다. 배양 후, 상기 세포들이 수집되었고, 상기 세포의 게놈 DNA가 PureHelix™ genomic DNA preparation kit (NanoHelix)를 사용하거나, Maxwell RSC Cultured cells DNA Kit (Promega)를 사용하여 수작업으로 분리되었다.

[1041] 실험예 1.4 세포 내 인텔 효율 측정

[1042] HEK-293 T세포로부터 분리된 게놈 DNA 중, 프로토스페이서를 포함하는 영역을 표적-특이적 프라이머를 사용하여 KAPA HiFi HotStart DNA polymerase (Roche)의 존재 하 PCR을 수행하였다. 상기 증폭 방법은 제조사의 지시를 따랐다. Illumina TruSeq HT dual indexes를 포함하는 상기 증폭의 결과물인 PCR 앰플리콘을 Illumina iSeq 100를 사용하여 150-bp 페어 엔드 시퀀싱을 수행하였다. 인텔 빈도는 MAUND를 사용하여 계산되었다. 상기 MAUND는 <https://github.com/ibscge/maund> 에서 제공된다.

[1043] 실험예 1.5 Quantitative real-time PCR

[1044] HEK293 T세포에 RNeasy Miniprep kit (Qiagen) 또는 Maxwell RSC miRNA Tissue Kit (Promega) 또는 DNeasy Blood & Tissue Kit(Qiagen)를 사용하여 가이드 RNA(또는 엔지니어링 된 가이드 RNA) 또는 게놈 DNA를 각각 추출하였다. 가이드 RNA를 정량화하기 위해서, RNA특이적 프라이머를 ligation 하고, crRNA-특이적 프라이머를 사용해 cDNA를 합성하였다. 상기 cDNA는 주형으로써 정량적 real-time PCR에 사용되었다. real-time PCR은 KAPA SYBR FAST qPCR Master Mix(2X) Kit (KAPABiosystems)를 사용하여 분석되었다.

[1045] 실험예 1.6 통계 분석

[1046] 각 실험에 별 실험은 3번씩 수행하였으며, 각 값의 평균값을 분석에 사용하였다.

[1047]

[1048] 실험예 2 엔지니어링 된 CRISPR/Cas12f1 시스템의 인텔 효율 비교

[1049] 엔지니어링 된 Cas12f1 가이드 RNA를 사용한 엔지니어링 된 CRISPR/Cas12f1 시스템의 인텔 효율을 측정하기 위해, 실험예 1.1 내지 1.2에 의해 각 실시예를 제조하였다. 실험에 사용한 표적 서열은 다음 [표02]에 나타냈다.

[1050] [표02]

Target Label	Protospacer sequence (5' to 3')	SEQ ID NO
DY2	CACACACACAGTGGGCTACC	422
DY10	CATCCCCAGGACACACACAC	423
Intergenic-22	AGAACACATACCCCTGGGCC	424

[1052] 각 실시예 별 엔지니어링 된 Cas12f1 가이드 RNA의 서열은 다음 [표03] 내지 [표08]에 나타냈다.

[1053] [표03]

Label	Target	PAM(5' to 3')	Engineered Cas12f1 guide RNA sequence (5' to 3')	SEQ ID NO
Comparative Example 1.1	DY2	TTTG	CUUCACUGAUAAA GUGGAGAACCGCUUACCAAAAAGCUGUCCUUAGGGGGAUUAGAACUUGAGUGAAAG GUGGGCUGCUUGCAUCAGCCUAAUGUCGAGAAUGUGCUUUCUUCGGAAGUAACCCUCGAAACAAAUUCA UUUAGAAAGAAUGAAGGAUUGCAACCAACACACACAGUGGGCUACC	380
Example 1.1	DY2	TTTG	GAUUAAGUGGAGAAACCGCUUACCAAAAAGCUGUCCUUAGGGGGAUUAGAACUUGAGUGAAAGUGGGCU GCUUAGCAUCAGCCUAAUGUCGAGAAUGUGCUUUCUUCGGAAGUAACCCUCGAAACAAAUUCAUUUAGAA GAAUGAAGGAAUGCAACCAACACACACAGUGGGCUACC	381
Example 1.2	DY2	TTTG	UGGAGAAACCGCUUACCAAAAAGCUGUCCUUAGGGGGAUUAGAACUUGAGUGAAGGUGGCUUGCAUC ACGCCUAAUGUCGAGAAAGUGCUUUCUUCGGAAGUAACCCUGAAACAAAUUCAUUUGAAGAAUGA AGGAUGCAACCAACACACACAGUGGGCUACC	382
Example 1.3	DY2	TTTG	ACCGCUUACCAAAAAGCUGUCCUUAGGGGGAUUAGAACUUGAGUGAAGGUGGGCUGCUUGCAUCAGCCU AAUGUCGAGAAAGUCUUUCUUCGGAAGUAACCCUCGAAACAAAUUCAUUUGAAGAAUGAAGGAAUG CAACCAACACACACAGUGGGCUACC	383
Example 1.4	DY2	TTTG	CUUCACUGAUAAA GUGGAGAACCGCUUACCAAAAAGCUGUUAUAGUUAAGUUAACUUGAGUGAAGGUGGGC UGCUUGCAUCAGCCUAAUGUCGAGAAUGUGCUUUCUUCGGAAGUAACCCUCGAAACAAAUUCAUUUGAA AGAAUGAAGGAAUGCAACCAACACACACAGUGGGCUACC	384
Example 1.5	DY2	TTTG	CUUCACUGAUAAA GUGGAGAACCGCUUACCAAAAAGCUGUUAAGUUAAGUUAACUUGAGUGAAGGUGGGCUGCUU GCAUCAGCCUAAUGUCGAGAAAGUGCUUUCUUCGGAAGUAACCCUCGAAACAAAUUCAUUUGAAGAA UGAAGGAAUGCAACCAACACACAGUGGGCUACC	385
Example 1.6	DY2	TTTG	CUUCACUGAUAAA GUGGAGAACCGCUUACCAUUAGUGAGUGAAGGUGGGCUGCUUGCAUCAGCCUAAU GUCGAGAAUGUGCUUUCUUCGGAAGUAACCCUCGAAACAAAUUCAUUUGAAGAAUGAAGGAUUGCAA CACACACACAGUGGGCUACC	386

Label	Target	PAM(5' to 3')	Engineered Cas12f1 guide RNA sequence (5' to 3')	SEQ ID NO
Example 1.7	DY2	TTTG	CUUCACUGAUAAAGUGGAGAACCGCUUACCCAAGACGUGCCCUUAGGGGAUUGAAGCUUGAGUGAAGGUGGGCUGCUUGCAUCAGCCUAUUGUCGAGAAUGGCUUUCUGGAAAGUAACCCUCGAAACAAAUUCAUGAAAGUAAGGAAGCAACACACACACAGUGGCUACC	387
Example 1.8	DY2	TTTG	CUUCACUGAUAAAGUGGAGAACCGCUUACCCAAGACGUGCCCUUAGGGGAUUGAAGCUUGAGUGAAGGUGGGCUGCUUGCAUCAGCCUAUUGUCGAGAAUGGCUUUCUGGAAAGUAACCCUCGAAACAAAUUCGAAAGAAUGGAUGCAACACACACACAGUGGGCUACC	388
Example 1.9	DY2	TTTG	CUUCACUGAUAAAGUGGAGAACCGCUUACCCAAGACGUGCCCUUAGGGGAUUGAAGCUUGAGUGAAGGUGGGCUGCUUGCAUCAGCCUAUUGUCGAGAAUGGCUUUCUGGAAAGUAACCCUCGAAACAAAGAAAGGAUGCAACACACACACAGUGGGCUACC	389
Example 1.10	DY2	TTTG	ACCGCUUACCAAUUAGUGAGUGAAGGUGGGCUGCUUGCAUCAGCCUAUUGUCGAGAAUGGCUUUCUCGGAAGUAACCCUCGAAACAAAUUCAUUGAAAGAAUGAAGGAUUGCAACACACACAGUGGGCUACC	390
Example 1.11	DY2	TTTG	ACCGCUUACCAAAAGCGUGUCCCUUAGGGGAUUAGAACUUGAGUGAAGGUGGGCUGCUUGCAUCAGCCUAUUGUCGAGAAUGCUUUCUGGAAAGUAACCCUCGAAACAAAGAAUGCAACACACACAGUGGGCUACC	391
Example 1.12	DY2	TTTG	CUUCACUGAUAAAGUGGAGAACCGCUUACCCAUUGAGUUGAGUAGGAAGUGGGCUGCUUGCAUCAGCCUAUGUCGAGAAUGGCUUUCUUCUGGAAAGUAACCCUCGAAACAAAGAAUGCAACACACACACAGUGGGCUACC	392
Example 1.13	DY2	TTTG	ACCGCUUACCAAUUAGUGAGUGAAGGUGGGCUGCUUGCAUCAGCCUAUUGUCGAGAAUGGCUUUCUCGGAAGUAACCCUCGAAACAAAGAAUGCAACACACACACAGUGGGCUACC	393
Example 1.14	DY2	TTTG	ACCGCUUACCUUAGAGUGAAGGUGGGCUGCUUGCAUCAGCCUAUUGUCGAGAAUGGCUUUCUCGGAAGUAACCCUCGAAACAAAGAAUGCAACACACACACAGUGGGCUACC	436

Label	Target	PAM(5' to 3')	Engineered Cas12f1 guide RNA sequence (5' to 3')	SEQ ID NO
Comparative Example 2.1	DY10	TTTG	CUUCACUGAUAAA GUGGGAACCGCUUACCAAAAAGCUGUCCUUUAGGGGAUUAGAACUUGAGUGAAAG GUGGGCUGCUUAGCAUCGACCUUAAUGUCGAGAAUGCUUUCUUCGGAAGUAACCCUCGAAACAAAUUCA UUUAGAAAGAUGAAGGAAUGCAACCAUCCCCAGGACACACAC	394
Example 2.1	DY10	TTTG	GAUAAAGUGGAGAAACCGCUUACCAAAAAGCUGUCCUUAGGGGAUUAGAACUUGAGUGAAAGUGGGCU GCUUGCAUCAAGCCUAAUGUCGAGAA GUGCUUUCUUCGGAAGUAACCCUCGAAACAAAUUCAUUUGAA GAAUGAAGGAAUGCAACCAUCCCCAGGACACACAC	395
Example 2.2	DY10	TTTG	UGGAGAACCGCUUACCAAAAAGCUGUCCUUAGGGGAUUAGAA CUUGAGUGAAGGUGGGCUGUGAAC UCAGCCUAAUGUCGAGAAAGUGCUUUCUUCGGAAGUAACCCUCGAAACAAAUUCA UUGGAGAAGAUGA AGGAUGCAACCAUCCCCAGGACACACAC	396
Example 2.3	DY10	TTTG	ACCGCUUACCAAAAAGCUGUCCUUAGGGGAUUAGAACUUGAGUGAAGGUGGGCUGUGCAUCAAGCCU AAUGUCGAGAAGUGCUUUCUUCGGAAGUAACCCUCGAAACAAAUUCAUUUGAAGAAUGAGGAAUG CAACCAUCCCCAGGACACACAC	397
Example 2.4	DY10	TTTG	CUUCACUGAUAAA GUGGAGAACCGCUUACCAAAAAGCUGUUAUAGAUAACUUGAGUGAAGGUGGGC UGCUUGCAUCAGCCUAAUGUCGAGAAAGUGCUUUCUUCGGAAGUAACCCUCGAAACAAAUUCAUUUGAA AGAAUGAAGGAAUGCAACCAUCCCCAGGACACACAC	398
Example 2.5	DY10	TTTG	CUUCACUGAUAAA GUGGAGAACCGCUUACCAAAAAGCUGUUAAGAUAACUUGAGUGAAGGUGGGCUGCUU GCAUCAGCCUAAUGUCGAGAAAGUGCUUUCUUCGGAAGUAACCCUCGAAACAAAUUCAUUUGAAGAA UGAAAGGAAUGCAACCAUCCCCAGGACACACAC	399
Example 2.6	DY10	TTTG	CUUCACUGAUAAA GUGGAGAACCGCUUACCAAAUAGUUGAGUGAAGGUGGGCUGUGCAUCAGCCUAA UGUCGAGAAAGUGCUUUCUUCGGAAGUAACCCUCGAAACAAAUUCAUUUGAAAGAAUGAAGGAAUGC AACCACUCCCCAGGACACACAC	400

[1060]

Label	Target	PAM(5' to 3')	Engineered Cas12f1 guide RNA sequence (5' to 3')	SEQ ID NO
Example 2.7	DY10	TTTG	CUUCACUGAUAAGUGGAGAACCGCUUACCAAAAGCUGUCCUUAGGGGAUUAGAACUUGAGUGAAAGUGGGGUGCUUGCAUCAGCCUAUUGUCGAGAAGUGCUUUCUUGGAAAGUAAACCCUGGAAACAAAUUCAUGAAAUGAAGGAUUGCAACCAUCCCCAGGACACACACAC	401
Example 2.8	DY10	TTTG	CUUCACUGAUAAGUGGAGAACCGCUUACCAAAAGCUGUCCUUAGGGGAUUAGAACUUGAGUGAAAGUGGGGUGCUUGCAUCAGCCUAUUGUCGAGAAGUGCUUUCUUGGAAAGUAAACCCUGGAAACAAAUUCGAAAGAAAGGAUUGCAACCAUCCCCAGGACACACAC	402
Example 2.9	DY10	TTTG	CUUCACUGAUAAGUGGAGAACCGCUUACCAAAAGCUGUCCUUAGGGGAUUAGAACUUGAGUGAAAGUGGGGUGCUUGCAUCAGCCUAUUGUCGAGAAGUGCUUUCUUGGAAAGUAAACCCUGGAAACAAAGAAAAGAAUGCAACCAUCCCCAGGACACACAC	403
Example 2.10	DY10	TTTG	ACCGCUUACCAAUUAGUUGAGUGAAGGUGGGUGCUUGCAUCAGCCUAUUGUCGAGAAGUGCUUUCUUGGAAAGUAAACCCUGGAAACAAAUUCAUUGAAGAAUGAAGGAUUGCAACCAUCCCCAGGACACACAC	404
Example 2.11	DY10	TTTG	ACCGCUUACCAAAAGCUGUCCUUAGGGGAUUAGAACUUGAGUGAAGGUGGGUGCUUGCAUCAGCCUAUUGUCGAGAAGUGCUUUCUUGGAAAGUAAACCCUGGAAACAAAGAAAGGAUUGCAACCAUCCCCAGGACACACAC	405
Example 2.12	DY10	TTTG	CUUCACUGAUAAGUGGAGAACCGCUUACCAAAAGCUGUCCUUAGGGGAUUAGAACUUGAGUGAAAGUGGGGUGCUUGCAUCAGCCUAUUGUCGAGAAGUGCUUUCUUGGAAAGUAAACCCUGGAAACAAAGAAAGGAUUGCAACCAUCCCCAGGACACACAC	406
Example 2.13	DY10	TTTG	ACCGCUUACCAAUUAGUUGAGUGAAGGUGGGUGCUUGCAUCAGCCUAUUGUCGAGAAGUGCUUUCUUGGAAAGUAAACCCUGGAAACAAAUUCAUUGAAGAAUGAAGGAUUGCAACCAUCCCCAGGACACACAC	407
Example 2.14	DY10	TTTG	ACCGCUUACCUUAGAGUGAAGGUGGGUGCUUGCAUCAGCCUAUUGUCGAGAAGUGCUUUCUUGGAAAGUAAACCCUGGAAACAAAGAAAGGAUUGCAACCAUCCCCAGGACACACAC	437

[1061]

[표 07]

[1062]

Label	Target	PAM(5' to 3')	Engineered Cas12f1 guide RNA sequence (5' to 3')	SEQ ID NO
Comparative Example 3.1	Intergenic-22	TTTA	CUUCACUGAUAAGUGGAGAACCGCUUACCAAAAGCUGUCCUUAGGGGAUUAGAACUUGAGUGAAAGUGGGGUGCUUGCAUCAGCCUAUUGUCGAGAAGUGCUUUCUUGGAAAGUAAACCCUGGAAACAAAUUCAUUGAAGAAUGAAGGAUUGCAACCAUCCCCAGGACACACAC	408
Example 3.1	Intergenic-22	TTTA	GAUAAAGUGGAGAACCGCUUACCAAAAGCUGUCCUUAGGGGAUUAGAACUUGAGUGAAGGUGGGUGCUUGCAUCAGCCUAUUGUCGAGAAGUGCUUUCUUGGAAAGUAAACCCUGGAAACAAAUUCAUUGAAGAAUGAAGGAUUGCAACCAUCCCCAGGACACACAC	409
Example 3.2	Intergenic-22	TTTA	UGGAGAACCGCUUACCAAAAGCUGUCCUUAGGGGAUUAGAACUUGAGUGAAGGUGGGUGCUUGCAUCAGCCUAUUGUCGAGAAGUGCUUUCUUGGAAAGUAAACCCUGGAAACAAAUUCAUUGAAGAAUGAAGGAUUGCAACCAUCCCCAGGACACACAC	410
Example 3.3	Intergenic-22	TTTA	ACCGCUUACCAAAAGCUGUCCUUAGGGGAUUAGAACUUGAGUGAAGGUGGGUGCUUGCAUCAGCCUAUUGUCGAGAAGUGCUUUCUUGGAAAGUAAACCCUGGAAACAAAUUCAUUGAAGAAUGAAGGAUUGCAACCAUCCCCAGGACACACAC	411
Example 3.4	Intergenic-22	TTTA	CUUCACUGAUAAGUGGAGAACCGCUUACCAAAAGCUGUCCUUAGGGGAUUAGAACUUGAGUGAAGGUGGGUGCUUGCAUCAGCCUAUUGUCGAGAAGUGCUUUCUUGGAAAGUAAACCCUGGAAACAAAUUCAUUGAAGAAUGAAGGAUUGCAACCAUCCCCAGGACACACAC	412
Example 3.5	Intergenic-22	TTTA	CUUCACUGAUAAGUGGAGAACCGCUUACCAAAAGCUGUCCUUAGGGGAUUAGAACUUGAGUGAAGGUGGGUGCUUGCAUCAGCCUAUUGUCGAGAAGUGCUUUCUUGGAAAGUAAACCCUGGAAACAAAUUCAUUGAAGAAUGAAGGAUUGCAACCAUCCCCAGGACACACAC	413
Example 3.6	Intergenic-22	TTTA	CUUCACUGAUAAGUGGAGAACCGCUUACCAAUUAGUUGAGUGAAGGUGGGUGCUUGCAUCAGCCUAUUGUCGAGAAGUGCUUUCUUGGAAAGUAAACCCUGGAAACAAAUUCAUUGAAGAAUGAAGGAUUGCAACCAUCCCCAGGACACACAC	414

[1063]

[표 08]

[1064]

Label	Target	PAM(5' to 3')	Engineered Cas12f1 guide RNA sequence (5' to 3')	SEQ ID NO
Example 3.7	Intergenic-22	TTTA	CUUCACUGAUAAGUGGAGAACCGCUUACCAAAAGCUGUCCUUAGGGGAUUAGAACUUGAGUGAAAGUGGGGUGCUUGCAUCAGCCUAUUGUCGAGAAGUGCUUUCUUGGAAAGUAAACCCUGGAAACAAAUUCAUGAAAUGAAGGAUUGCAACCAUCCCCAGGACACACAC	415
Example 3.8	Intergenic-22	TTTA	CUUCACUGAUAAGUGGAGAACCGCUUACCAAAAGCUGUCCUUAGGGGAUUAGAACUUGAGUGAAAGUGGGGUGCUUGCAUCAGCCUAUUGUCGAGAAGUGCUUUCUUGGAAAGUAAACCCUGGAAACAAAUUCGAAAGAAAGGAUUGCAACCAUCCCCAGGACACACAC	416
Example 3.9	Intergenic-22	TTTA	CUUCACUGAUAAGUGGAGAACCGCUUACCAAAAGCUGUCCUUAGGGGAUUAGAACUUGAGUGAAAGUGGGGUGCUUGCAUCAGCCUAUUGUCGAGAAGUGCUUUCUUGGAAAGUAAACCCUGGAAACAAAGAAAAGAAUGCAACCAUCCCCAGGACACACAC	417
Example 3.10	Intergenic-22	TTTA	ACCGCUUACCAAUUAGUUGAGUGAAGGUGGGUGCUUGCAUCAGCCUAUUGUCGAGAAGUGCUUUCUUGGAAAGUAAACCCUGGAAACAAAUUCAUUGAAGAAUGAAGGAUUGCAACCAUCCCCAGGACACACAC	418
Example 3.11	Intergenic-22	TTTA	ACCGCUUACCAAAAGCUGUCCUUAGGGGAUUAGAACUUGAGUGAAGGUGGGUGCUUGCAUCAGCCUAUUGUCGAGAAGUGCUUUCUUGGAAAGUAAACCCUGGAAACAAAGAAAGGAUUGCAACCAUCCCCAGGACACACAC	419
Example 3.12	Intergenic-22	TTTA	CUUCACUGAUAAGUGGAGAACCGCUUACCAAUUAGUUGAGUGAAGGUGGGUGCUUGCAUCAGCCUAUUGUCGAGAAGUGCUUUCUUGGAAAGUAAACCCUGGAAACAAAGAAAGGAUUGCAACCAUCCCCAGGACACACAC	420
Example 3.13	Intergenic-22	TTTA	ACCGCUUACCAAUUAGUUGAGUGAAGGUGGGUGCUUGCAUCAGCCUAUUGUCGAGAAGUGCUUUCUUGGAAAGUAAACCCUGGAAACAAAGAAAGGAUUGCAACCAUCCCCAGGACACACAC	421
Example 3.14	Intergenic-22	TTTA	ACCGCUUACCUUAGAGUGAAGGUGGGUGCUUGCAUCAGCCUAUUGUCGAGAAGUGCUUUCUUGGAAAGUAAACCCUGGAAACAAAGAAAGGAUUGCAACCAUCCCCAGGACACACAC	438

[1065] 이때, 각 표적 서열 별로,

[1066] 1) Comparative Example n.1은 자연계에서 발견되는 Cas12f1 tracrRNA 및 자연계에서 발견되는 Cas12f1 crRNA를 5'-GAAA-3'로 연결시킨 싱글 가이드 RNA,

[1067] 2) Example n.1 내지 n.3은 변형된 제1 영역을 가지는 엔지니어링 된 스캐폴드 영역, 및 스페이서를 가지는 엔지니어링 된 Cas12f1 가이드 RNA,

- [1068] 3) Example n.4 내지 n.6는 변형된 제2 영역을 가지는 엔지니어링 된 스캐폴드 영역, 및 스페이서를 가지는 엔지니어링 된 Cas12f1 가이드 RNA,
- [1069] 4) Example n.7 내지 n.9는 변형된 제4 영역 및 제5 영역을 가지는 엔지니어링 된 스캐폴드 영역, 및 스페이서를 가지는 엔지니어링 된 Cas12f1 가이드 RNA,
- [1070] 5) Example n.10은 변형된 제1 영역 및 제2 영역을 가지는 엔지니어링 된 스캐폴드 영역, 및 스페이서를 가지는 엔지니어링 된 Cas12f1 가이드 RNA,
- [1071] 6) Example n.11은 변형된 제1 영역 및 제4 영역 및 제5 영역을 가지는 엔지니어링 된 스캐폴드 영역, 및 스페이서를 가지는 엔지니어링 된 Cas12f1 가이드 RNA,
- [1072] 7) Example n.12는 변형된 제2 영역 및 제4 영역 및 제5 영역을 가지는 엔지니어링 된 스캐폴드 영역, 및 스페이서를 가지는 엔지니어링 된 Cas12f1 가이드 RNA,
- [1073] 8) Example n.13 및 Example n.14는 변형된 제1 영역, 제2 영역, 및 제4 영역 및 제5 영역을 가지는 엔지니어링 된 스캐폴드 영역, 및 스페이서를 가지는 엔지니어링 된 Cas12f1 가이드 RNA를 나타낸다.
- [1074] 이때, n은 표적 서열 별로, 1, 2, 또는 3이며, n이 1인 경우 Target 1(DY2), n이 2인 경우, Target 2(DY10), n이 3인 경우, Target3(Intergenic-22)를 나타낸다.
- [1075] 상기 실시예 별 제조된 벡터를 실험예 1.3에 의해 HEK293 T세포에 형질도입(transfection)하고, 실험예 1.4 내지 1.5에 의해 인델 발생 효율을 측정하였다. 이를 실험예 1.6에 의해 분석한 결과가 도 2 내지 도 13에 나타나있다.
- [1076] 도 2 내지 도 4는 DY2를 표적으로 하는 Example 1.1 내지 Example 1.13에 대한 평균 indel 효율, 도 5 내지 도 8은 DY10을 표적으로 하는 Example 2.1 내지 Example 2.13에 대한 평균 indel 효율, 도 9 내지 도 12는 Intergenic-22를 표적으로 하는 Example 3.1 내지 Example 3.13에 대한 평균 indel 효율, 도 13은, DY2를 표적으로 하는 Example 1.13 내지 Example 1.14, DY10을 표적으로 하는 Example 2.13 내지 Example 2.14, Intergenic-22를 표적으로 하는 Example 3.13 내지 Example 3.14에 대한 평균 indel 효율을 각각 나타낸다.
- [1077] 실험 결과, 본 명세서에서 개시하는 엔지니어링 된 스캐폴드 영역을 가지는 엔지니어링 된 Cas12f1 가이드 RNA를 유전자 편집에 사용하는 경우, 자연계에서 발견되는 스캐폴드 영역을 가지는 Cas12f1 가이드 RNA, 및 상기 자연계에서 발견되는 스캐폴드 영역의 tracrRNA, 및 crRNA 반복 서열 부분을 5'-GAAA-3' 링커로 연결한 가이드 RNA를 유전자 편집에 사용할 때보다 전반적으로 유전자 편집 효율이 향상됨을 알 수 있다. 또한, 각 영역 별 변형을 조합한 경우(e.g. Example n.10 내지 Example n.14), 각 영역 별 조합이 시너지를 일으켜 유전자 편집 효율이 더욱 더 향상됨을 알 수 있다.

[1078]

[1079]

산업상 이용가능성

- [1080] 본 명세서에서는 유전자 편집 기술에 사용할 수 있는 CRISPR/Cas12f1 시스템을 제공하며, 특히, 엔지니어링 된 스캐폴드 영역을 도입하여 유전자 편집 효율을 향상시킨 엔지니어링 된 CRISPR/Cas12f1 시스템을 제공한다. 본 명세서에서 제공하는 엔지니어링 된 CRISPR/Cas12f1 시스템을 유전자 편집에 사용하는 경우, 자연계에서 발견되는 CRISPR/Cas12f1 시스템을 사용하는 것과 비교해 높은 유전자 편집 효율을 나타내며, 진핵세포 유전자를 편집하는 용도로 사용할 수 있다.

청구범위

- [청구항 1] 다음을 포함하는, CRISPR/Cas12f1 시스템을 위한 엔지니어링 된 가이드 RNA:
- 엔지니어링 된 스캐폴드 영역; 및
- 스페이서;
- 이때, 상기 엔지니어링 된 가이드 RNA는 5'말단에서 3'말단 방향으로, 엔지니어링 된 스캐폴드 영역, 및 스페이서가 순서대로 연결되어 있고, 상기 스페이서는 10개 이상 50개 이하의 뉴클레오타이드를 포함하며, 표적 서열과 상보적인 서열을 가지고,
- 상기 엔지니어링 된 스캐폴드 영역의 서열은
- 5'-CUUCACUGAUAAAGUGGAGAACCGCUUCACCAAAAGCUGUCCC
UUAGGGGAUUAGAACUUGAGUGAAGGUGGGCUGCUUGCAUCAGC
CUAAUGUCGAGAAGUGCUUUCUUCGGAAAGUAACCCUCGAAACAA
AUUCAUUUGAAAGAAUGAAGGAAUGCAAC-3'(서열번호 7)과 상이한
것을 특징으로 하며,
- 상기 엔지니어링 된 스캐폴드 영역의 서열은 5'말단에서 3'말단 방향으로
다음 서열이 순서대로 연결된 것임:
- 5'-A-3', 5'-AA-3', 5'-GAA-3', 5'-AGAA-3', 5'-GAGAA-3', 5'-GGAGAA-3',
5'-UGGAGAA-3', 5'-GUGGAGAA-3', 5'-AGUGGAGAA-3',
5'-AAGUGGAGAA-3'(서열번호 16), 5'-AAAGUGGAGAA-3'(서열번호 17),
5'-UAAAGUGGAGAA-3'(서열번호 18),
5'-AUAAGUGGAGAA-3'(서열번호 19),
5'-GAUAAGUGGAGAA-3'(서열번호 20),
5'-UGAUAAGUGGAGAA-3'(서열번호 21),
5'-CUGAUAAGUGGAGAA-3'(서열번호 22),
5'-ACUGAUAAGUGGAGAA-3'(서열번호 23),
5'-CACUGAUAAGUGGAGAA-3'(서열번호 24),
5'-UCACUGAUAAGUGGAGAA-3'(서열번호 25),
5'-UUCACUGAUAAGUGGAGAA-3'(서열번호 26), 및
5'-CUUCACUGAUAAGUGGAGAA-3'(서열번호 9)로 이루어진 군에서
선택된 서열;
- 5'-CCGCUUCACUUAGAGUGAAGGUGG-3'(서열번호 430),
5'-CCGCUUCACCUUAGGAGUGAAGGUGG-3'(서열번호 431),
5'-CCGCUUCACCAUUAGUGAGUGAAGGUGG-3'(서열번호 38),
5'-CCGCUUCACCAAUUAGUUGAGUGAAGGUGG-3'(서열번호 39),
5'-CCGCUUCACCAAAUUAGCUUGAGUGAAGGUGG-3'(서열번호 40),
5'-CCGCUUCACCAAAAUUAGACUUGAGUGAAGGUGG-3'(서열번호

41),
 5'-CCGCUUCACCAAAAAGUUAGAACUUGAGUGAAGGUGG-3'(서열번호 42),
 5'-CCGCUUCACCAAAAAGCUUAGGAACUUGAGUGAAGGUGG-3'(서열번호 43),
 5'-CCGCUUCACCAAAAAGCUUUAGAGAACUUGAGUGAAGGUGG-3'(서열번호 44),
 5'-CCGCUUCACCAAAAAGCUGUUAGUUAGAACUUGAGUGAAGGUGG-3'(서열번호 45),
 5'-CCGCUUCACCAAAAAGCUGUUAGUAGAACUUGAGUGAAGGUGG-3'(서열번호 46),
 5'-CCGCUUCACCAAAAAGCUGUUUAGAUUAGAACUUGAGUGAAGGUGG-3'(서열번호 47),
 5'-CCGCUUCACCAAAAAGCUGUCUUAGGAUUAGAACUUGAGUGAAGGUGG-3'(서열번호 48),
 5'-CCGCUUCACCAAAAAGCUGUCCUUAGGGAUUAGAACUUGAGUGAAGGUGG-3'(서열번호 49), 및
 5'-CCGCUUCACCAAAAAGCUGUCCCUUAGGGGAUUAGAACUUGAGUGAAGGUGG-3'(서열번호 10)로 이루어진 군에서 선택된 서열;
 5'-GCUGCUUGCAUCAGCCUAAUGUCGAGAAGUGCUUUCUUCGGAAAGUAACCCUCGA-3'(서열번호 11);
 5'-AACAAAGAAAGGA-3'(서열번호 110),
 5'-AACAAAUGAAAAGGA-3'(서열번호 111),
 5'-AACAAAUUGAAAAAGGA-3'(서열번호 112),
 5'-AACAAAUUCGAAAGAAGGA-3'(서열번호 113),
 5'-AACAAAUUCAGAAAUGAAGGA-3'(서열번호 114),
 5'-AACAAAUUCAUGAAAAUGAAGGA-3'(서열번호 115),
 5'-AACAAAUUCAUUGAAAAUGAAGGA-3'(서열번호 116), 및
 5'-AACAAAUUCAUUUGAAAGAAUGAAGGA-3'(서열번호 117)에서 선택된 서열; 및
 5'-AUGCAAC-3'.

[청구항 2] 다음을 포함하는, CRISPR/Cas12f1 시스템을 위한 엔지니어링 된 가이드 RNA:

엔지니어링 된 스캐폴드 영역; 및
 스페이서; 및

이때, 상기 엔지니어링 된 가이드 RNA는 5'말단에서 3'말단 방향으로, 엔지니어링 된 스캐폴드 영역, 및 스페이서가 순서대로 연결되어 있고, 상기 스페이서는 10개 이상 50개 이하의 뉴클레오타이드를 포함하며,

표적 서열과 상보적인 서열을 가지고,

상기 엔지니어링 된 스캐폴드 영역의 서열은

5'-CUUCACUGAUAAAGUGGAGAACCGCUUCACCAAAAGCUGUCCC
UUAGGGGAUUAGAACUUGAGUGAAGGUGGGCUGCUUGCAUCAGC
CUAAUGUCGAGAAGUGCUUUCUUCGGAAAGUAACCCUCGAAACAA
AUUCAUUUUUCCUCUCCAAUUCUGCACAAGAAAGUUGCAGAACCC
GAAUAGACGAAUGAAGGAAUGCAAC-3'(서열번호 315)과 상이한 것을
특징으로 하며,

상기 엔지니어링 된 스캐폴드 영역의 서열은 5'말단에서 3'말단 방향으로
다음 서열이 순서대로 연결된 것임:

5'-A-3', 5'-AA-3', 5'-GAA-3', 5'-AGAA-3', 5'-GAGAA-3', 5'-GGAGAA-3',
5'-UGGAGAA-3', 5'-GUGGAGAA-3', 5'-AGUGGAGAA-3',
5'-AAGUGGAGAA-3'(서열번호 16), 5'-AAAGUGGAGAA-3'(서열번호 17),
5'-UAAAGUGGAGAA-3'(서열번호 18),
5'-AUAAAGUGGAGAA-3'(서열번호 19),
5'-GAUAAAGUGGAGAA-3'(서열번호 20),
5'-UGAUAAAGUGGAGAA-3'(서열번호 21),
5'-CUGAUAAAGUGGAGAA-3'(서열번호 22),
5'-ACUGAUAAAGUGGAGAA-3'(서열번호 23),
5'-CACUGAUAAAGUGGAGAA-3'(서열번호 24),
5'-UCACUGAUAAAGUGGAGAA-3'(서열번호 25),
5'-UUCACUGAUAAAGUGGAGAA-3'(서열번호 26), 및
5'-CUUCACUGAUAAAGUGGAGAA-3'(서열번호 9)로 이루어진 군에서
선택된 서열;
5'-CCGCUUCACUAGAGUGAAGGUGG-3'(서열번호 430),
5'-CCGCUUCACCUAGGAGUGAAGGUGG-3'(서열번호 431),
5'-CCGCUUCACCAUAGUGAGUGAAGGUGG-3'(서열번호 38),
5'-CCGCUUCACCAAUAGUUGAGUGAAGGUGG-3'(서열번호 39),
5'-CCGCUUCACCAAAUAGCUUGAGUGAAGGUGG-3'(서열번호 40),
5'-CCGCUUCACCAAAAUAGACUUGAGUGAAGGUGG-3'(서열번호
41),
5'-CCGCUUCACCAAAAGUUAGAACUUGAGUGAAGGUGG-3'(서열번
호 42),
5'-CCGCUUCACCAAAAGCUUAGGAACUUGAGUGAAGGUGG-3'(서열
번호 43),
5'-CCGCUUCACCAAAAGCUUUAGAGAACUUGAGUGAAGGUGG-3'(서
열번호 44),
5'-CCGCUUCACCAAAAGCUGUUAGUUAGAACUUGAGUGAAGGUGG

-3'(서열번호 45),
 5'-CCGCUUCACCAAAAGCUGUUAGUAGAACUUGAGUGAAGGUGG-3'
 (서열번호 46),
 5'-CCGCUUCACCAAAAGCUGUUUAGAUUAGAACUUGAGUGAAGGU
 GG-3'(서열번호 47),
 5'-CCGCUUCACCAAAAGCUGUCUUAGGAUUAGAACUUGAGUGAAG
 GUGG-3'(서열번호 48),
 5'-CCGCUUCACCAAAAGCUGUCCUUAGGGAUUAGAACUUGAGUGA
 AGGUGG-3'(서열번호 49), 및
 5'-CCGCUUCACCAAAAGCUGUCCCUUAGGGGAUUAGAACUUGAGU
 GAAGGUGG-3'(서열번호 10)로 이루어진 군에서 선택된 서열;
 5'-GCUGCUUGCAUCAGCCUAAUGUCGAGAAGUGCUUUCUUCGGAA
 AGUAACCCUCGA-3'(서열번호 11);
 5'-AACAAAGAAAGGA-3'(서열번호 110),
 5'-AACAAUUGAAAAGGA-3'(서열번호 111),
 5'-AACAAUUGAAAAAGGA-3'(서열번호 112),
 5'-AACAAUUCGAAAGAAGGA-3'(서열번호 113),
 5'-AACAAUUCAGAAAUGAAGGA-3'(서열번호 114),
 5'-AACAAUUCAUGAAAUGAAGGA-3'(서열번호 115),
 5'-AACAAUUCAUUGAAAAUGAAGGA-3'(서열번호 116),
 5'-AACAAUUCAUUUGAAAGAAUGAAGGA-3'(서열번호 117),
 5'-AACAAUUCAUUUUGAAACGAAUGAAGGA-3'(서열번호 293),
 5'-AACAAUUCAUUUUUGAAACGAAUGAAGGA-3'(서열번호 294),
 5'-AACAAUUCAUUUUUCGAAAGACGAAUGAAGGA-3'(서열번호
 295),
 5'-AACAAUUCAUUUUUCCGAAAAGACGAAUGAAGGA-3'(서열번호
 296),
 5'-AACAAUUCAUUUUUCCUGAAAUAGACGAAUGAAGGA-3'(서열번
 호 297),
 5'-AACAAUUCAUUUUUCCUCGAAAAUAGACGAAUGAAGGA-3'(서
 열번호 298),
 5'-AACAAUUCAUUUUUCCUCUGAAAAUAGACGAAUGAAGGA-3'(서
 열번호 299),
 5'-AACAAUUCAUUUUUCCUCUCGAAAGAAUAGACGAAUGAAGGA
 -3'(서열번호 300),
 5'-AACAAUUCAUUUUUCCUCUCCGAAACGAAUAGACGAAUGAAG
 GA-3'(서열번호 301),
 5'-AACAAUUCAUUUUUCCUCUCCAGAAACCGAAUAGACGAAUGA

AGGA-3'(서열번호 302),
 5'-AACAAAUUCAUUUUUCCUCUCCAAGAAACCCGAAUAGACGAAU
 GAAGGA-3'(서열번호 303),
 5'-AACAAAUUCAUUUUUCCUCUCCAUGAAAACCCGAAUAGACGA
 AUGAAGGA-3'(서열번호 304),
 5'-AACAAAUUCAUUUUUCCUCUCCA AUUGAAAAACCCGAAUAGAC
 GAAUGAAGGA-3'(서열번호 305),
 5'-AACAAAUUCAUUUUUCCUCUCCA AUUCGAAAGAACCCGAAUAG
 ACGAAUGAAGGA-3'(서열번호 306),
 5'-AACAAAUUCAUUUUUCCUCUCCA AUUCUGAAAAGAACCCGAAU
 AGACGAAUGAAGGA-3'(서열번호 307),
 5'-AACAAAUUCAUUUUUCCUCUCCA AUUCUGGAAACAGAACCCGA
 AUAGACGAAUGAAGGA-3'(서열번호 308),
 5'-AACAAAUUCAUUUUUCCUCUCCA AUUCUGCGAAAGCAGAACCC
 GAAUAGACGAAUGAAGGA-3'(서열번호 309),
 5'-AACAAAUUCAUUUUUCCUCUCCA AUUCUGCAGAAAUGCAGAAC
 CCGAAUAGACGAAUGAAGGA-3'(서열번호 310),
 5'-AACAAAUUCAUUUUUCCUCUCCA AUUCUGCACGAAAUUGCAGA
 ACCCGAAUAGACGAAUGAAGGA-3'(서열번호 311),
 5'-AACAAAUUCAUUUUUCCUCUCCA AUUCUGCACAGAAAGUUGCA
 GAACCCGAAUAGACGAAUGAAGGA-3'(서열번호 312),
 5'-AACAAAUUCAUUUUUCCUCUCCA AUUCUGCACAGAAAUUGCAG
 AACCCGAAUAGACGAAUGAAGGA-3'(서열번호 313), 및
 5'-AACAAAUUCAUUUUUCCUCUCCA AUUCUGCACAAGAAAGUUGC
 AGAACCCGAAUAGACGAAUGAAGGA-3'(서열번호 314)로 이루어진
 군에서 선택된 서열; 및
 5'-AUGCAAC-3'.

[청구항 3] 제 1항에 있어서, 상기 스캐폴드 영역의 서열은 5'말단에서 3'말단
 방향으로 다음 서열이 순서대로 연결된 것을 특징으로 하는 엔지니어링
 된 가이드 RNA:

5'-A-3';
 5'-CCGCUUCACCAAAGCUGUCCCUUAGGGGAUUAGAACUUGAGU
 GAAGGUGG-3'(서열번호 10);
 5'-GCUGCUUGCAUCAGCCUAAUGUCGAGAAGUGCUUUCUUCGGAA
 AGUAACCCUCGA-3'(서열번호 11);
 5'-AACAAAGAAAGGA-3'(서열번호 110); 및
 5'-AUGCAAC-3'.

[청구항 4] 제 1항에 있어서, 상기 스캐폴드 영역의 서열은 5'말단에서 3'말단

방향으로 다음 서열이 순서대로 연결된 것을 특징으로 하는 엔지니어링 된 가이드 RNA:

5'-A-3';

5'-CCGCUUCACUUAGAGUGAAGGUGG-3'(서열번호 430);

5'-GCUGCUUGCAUCAGCCUAAUGUCGAGAAGUGCUUUCUUCGGAAAGUAACCCUCGA-3'(서열번호 11);

5'-AACAAAGAAAGGA-3'(서열번호 110); 및

5'-AUGCAAC-3'.

[청구항 5] 다음을 포함하는, CRISPR/Cas12f1 시스템을 위한 엔지니어링 된 가이드 RNA:

엔지니어링 된 스캐폴드; 및

스페이서,

이때, 상기 엔지니어링 된 가이드 RNA는 5'말단에서 3'말단 방향으로, 엔지니어링 된 스캐폴드 영역, 및 스페이서가 순서대로 연결되어 있고, 상기 스페이서는 10 내지 50 뉴클레오타이드 길이를 가지며, 표적 서열과 상보적인 서열을 가지며,

상기 엔지니어링 된 스캐폴드 영역의 서열은 5'말단에서 3'말단 방향으로 다음 서열이 순서대로 연결된 것임:

5'-A-3'로 표현되는 제1 서열;

5'-CCGCUUCAC-3'(서열번호 432)로 표현되는 제2 서열;

5'-UUAG-3'로 표현되는 제3 서열;

5'-AGUGAAGGUGG-3'(서열번호 433)로 표현되는 제4 서열;

5'-GCUGCUUGCAUCAGCCUAAUGUCGAGAAGUGCUUUCUUCGGAAAGUAACCCUCGA-3'(서열번호 11)로 표현되는 제5 서열;

5'-AACAAA-3'로 표현되는 제6 서열;

링커;

5'-GGA-3'로 표현되는 제7 서열; 및

5'-AUGCAAC-3'로 표현되는 제8 서열.

[청구항 6] 제5항에 있어서, 상기 링커는 5'-GAAA-3'인 것을 특징으로 하는 엔지니어링 된 가이드 RNA.

[청구항 7] 제5항에 있어서, 상기 링커는 5'-GAAA-3', 5'-UGAAAA-3', 5'-UUGAAAAA-3', 5'-UUCGAAAGAA-3'(서열번호 425), 5'-UUCAGAAAUGAA-3'(서열번호 426), 5'-UUCAUGAAAAUGAA-3'(서열번호 427), 및 5'-UUCAUUGAAAAAUGAA-3'(서열번호 428)로 이루어진 군에서 선택된 것을 특징으로 하는 엔지니어링 된 가이드 RNA.

[청구항 8] 제5항에 있어서, 상기 엔지니어링 된 스캐폴드 영역의 서열은 5'-A-3', 5'-GA-3', 5'-AGA-3', 5'-GAGA-3', 5'-GGAGA-3', 5'-UGGAGA-3',

5'-GUGGAGA-3', 5'-AGUGGAGA-3', 5'-AAGUGGAGA-3',
 5'-AAAGUGGAGA-3'(서열번호 27), 5'-UAAAGUGGAGA-3'(서열번호 28),
 5'-AUAAAGUGGAGA-3'(서열번호 29),
 5'-GAUAAAGUGGAGA-3'(서열번호 30),
 5'-UGAUAAAGUGGAGA-3'(서열번호 31),
 5'-CUGAUAAAGUGGAGA-3'(서열번호 32),
 5'-ACUGAUAAAGUGGAGA-3'(서열번호 33),
 5'-CACUGAUAAAGUGGAGA-3'(서열번호 34),
 5'-UCACUGAUAAAGUGGAGA-3'(서열번호 35),
 5'-UUCACUGAUAAAGUGGAGA-3'(서열번호 36), 및
 5'-CUUCACUGAUAAAGUGGAGA-3'(서열번호 37)로 이루어진 군에서
 선택된 제9 서열을 추가적으로 포함하며, 상기 제9 서열의 3'말단은 상기
 제1 서열의 5'말단과 연결되어 있는 것을 특징으로 하는 엔지니어링 된
 가이드 RNA.

[청구항 9] 제5항에 있어서, 상기 엔지니어링 된 스캐폴드 영역의 서열은,
 5'-A-3', 5'-AA-3', 5'-AAA-3', 5'-AAAG-3', 5'-AAAGC-3', 5'-AAAGCU-3',
 5'-AAAGCUG-3', 5'-AAAGCUGU-3', 5'-AAAGCUGUC-3',
 5'-AAAGCUGUCC-3'(서열번호 52), 및 5'-AAAGCUGUCCC-3'(서열번호
 53)로 이루어진 군에서 선택된 제10 서열, 및
 5'-U-3', 5'-CU-3', 5'-ACU-3', 5'-AACU-3', 5'-GAACU-3', 5'-AGAACU-3',
 5'-UAGAACU-3', 5'-UUAGAACU-3', 5'-AUUAGAACU-3',
 5'-GAUUAGAACU-3'(서열번호 54), 5'-GGAUUAGAACU-3'(서열번호 55),
 및 5'-GGGAUUAGAACU-3'(서열번호 56)로 이루어진 군에서 선택된 제11
 서열을 추가적으로 포함하며,
 상기 제2 서열의 3'말단 및 상기 제3 서열의 5'말단은 상기 제10 서열을
 통해 연결되어 있고,
 상기 제3 서열의 3'말단 및 상기 제4 서열의 5'말단은 상기 제11 서열을
 통해 연결되어 있는 것을 특징으로 하는 엔지니어링 된 가이드 RNA.

[청구항 10] 제9항에 있어서,
 상기 제10 서열이 5'-A-3'인 경우, 상기 제11 서열은 5'-U-3'이고,
 상기 제10 서열이 5'-AA-3'인 경우, 상기 제11 서열은 5'-CU-3'이고,
 상기 제10 서열이 5'-AAA-3'인 경우, 상기 제11 서열은 5'-ACU-3'이고,
 상기 제10 서열이 5'-AAAG-3'인 경우, 상기 제11 서열은 5'-AACU-3'이고,
 상기 제10 서열이 5'-AAAGC-3'인 경우, 상기 제11 서열은
 5'-GAACU-3'이고,
 상기 제10 서열이 5'-AAAGCU-3'인 경우, 상기 제11 서열은
 5'-AGAACU-3'이고,
 상기 제10 서열이 5'-AAAGCUG-3'인 경우, 상기 제11 서열은

5'-UAGAACU-3' 또는 5'-UUAGAACU-3'이고,
 상기 제10 서열이 5'-AAAGCUGU-3'인 경우, 상기 제11 서열은
 5'-AUUAGAACU-3'이고,
 상기 제10 서열이 5'-AAAGCUGUC-3'인 경우, 상기 제11 서열은
 5'-GAUUAGAACU-3'(서열번호 54)이고,
 상기 제10 서열이 5'-AAAGCUGUCC-3'(서열번호 52)인 경우, 상기 제11
 서열은 5'-GGAUUAGAACU-3'(서열번호 55)이고,
 상기 제10 서열이 5'-AAAGCUGUCCC-3'(서열번호 53)인 경우, 상기 제11
 서열은 5'-GGGAUUAGAACU-3'(서열번호 56)이고,
 상기 제10 서열이 5'-AAAAGCUGUCCC-3'(서열번호 440)인 경우, 상기
 제11 서열은 5'-GGGAUUAGAACUU-3'(서열번호 442) 일 수 있다.
 상기 제10 서열이 5'-CAAAAGCUGUCCC-3'(서열번호 441)인 경우, 상기
 제11 서열은 5'-GGGAUUAGAACUUG-3'(서열번호 443) 인 것을 특징으로
 하는 엔지니어링 된 가이드 RNA.

[청구항 11] 제10항에 있어서, 상기 제10 서열은 5'-CAAAAGCUGUCCC-3'(서열번호 441)이고, 상기 제11 서열은 5'-GGGAUUAGAACUUG-3'(서열번호 443)인 것을 특징으로 하는 엔지니어링 된 가이드 RNA.

[청구항 12] 제5항에 있어서, 상기 엔지니어링 된 스캐폴드 영역의 서열은,
 5'-U-3', 5'-UU-3', 5'-UUC-3', 5'-UUCA-3', 5'-UUCAU-3', 5'-UUCAUU-3', 및
 5'-UUCAUUU-3'로 이루어진 군에서 선택된 제 12서열, 및
 5'-A-3', 5'-AA-3', 5'-GAA-3', 5'-UGAA-3', 5'-AUGAA-3', 5'-AAUGAA-3', 및
 5'-GAAUGAA-3'로 이루어진 군에서 선택된 제 13서열을 추가적으로
 포함하며,
 이때, 상기 제6 서열의 3'말단 및 상기 링커의 5'말단은 상기 제12 서열을
 통해 연결되고,
 상기 링커의 3'말단 및 상기 제7 서열의 5'말단은 상기 제13 서열을 통해
 연결되어 있는 것을 특징으로 하는 엔지니어링 된 가이드 RNA.

[청구항 13] 제12항에 있어서,
 상기 제12 서열이 5'-U-3'인 경우, 상기 제13 서열은 5'-A-3'이고,
 상기 제12 서열이 5'-UU-3'인 경우, 상기 제13 서열은 5'-AA-3'이고,
 상기 제12 서열이 5'-UUC-3'인 경우, 상기 제13 서열은 5'-GAA-3'이고,
 상기 제12 서열이 5'-UUCA-3'인 경우, 상기 제13 서열은 5'-UGAA-3'이고,
 상기 제12 서열이 5'-UUCAU-3'인 경우, 상기 제13 서열은
 5'-AUGAA-3'이고,
 상기 제12 서열이 5'-UUCAUU-3'인 경우, 상기 제13 서열은
 5'-AAUGAA-3'이고,
 상기 제12 서열이 5'-UUCAUUU-3'인 경우, 상기 제13 서열은
 5'-GAAUGAA-3'인 것을 특징으로 하는 엔지니어링 된 가이드 RNA.

- [청구항 14] 다음을 포함하는 CRISPR/Cas12f1 시스템을 위한 엔지니어링 된 가이드 RNA:
- 엔지니어링 된 스캐폴드 영역; 및
- 스페이서;
- 이때, 상기 스페이서는 10 내지 50 뉴클레오타이드 길이를 가지며, 표적 서열과 상보적인 서열을 가지며,
- 상기 엔지니어링 된 스캐폴드 영역의 서열은 다음 서열을 포함함:
- 5'말단에서 3'말단 방향으로,
- 5'-A-3', 5'-AA-3', 5'-GAA-3', 5'-AGAA-3', 5'-GAGAA-3', 5'-GGAGAA-3',
- 5'-UGGAGAA-3', 5'-GUGGAGAA-3', 5'-AGUGGAGAA-3',
- 5'-AAGUGGAGAA-3'(서열번호 16), 5'-AAAGUGGAGAA-3'(서열번호 17),
- 5'-UAAAGUGGAGAA-3'(서열번호 18),
- 5'-AUAAAGUGGAGAA-3'(서열번호 19),
- 5'-GAUAAAGUGGAGAA-3'(서열번호 20),
- 5'-UGAUAAAGUGGAGAA-3'(서열번호 21),
- 5'-CUGAUAAAGUGGAGAA-3'(서열번호 22),
- 5'-ACUGAUAAAGUGGAGAA-3'(서열번호 23),
- 5'-CACUGAUAAAGUGGAGAA-3'(서열번호 24),
- 5'-UCACUGAUAAAGUGGAGAA-3'(서열번호 25),
- 5'-UUCACUGAUAAAGUGGAGAA-3'(서열번호 26), 및
- 5'-CUUCACUGAUAAAGUGGAGAA-3'(서열번호 9)로 이루어진 군에서 선택된 서열,
- 5'-CCGCUUCACUUAAGAGUGAAGGUGG-3'(서열번호 430),
- 5'-CCGCUUCACCUUAAGGAGUGAAGGUGG-3'(서열번호 431),
- 5'-CCGCUUCACCAUUAAGUGAGUGAAGGUGG-3'(서열번호 38),
- 5'-CCGCUUCACCAAUUAAGUAGUGAAGGUGG-3'(서열번호 39),
- 5'-CCGCUUCACCAAAUUAAGCUUGAGUGAAGGUGG-3'(서열번호 40),
- 5'-CCGCUUCACCAAAAUAAGACUUGAGUGAAGGUGG-3'(서열번호 41),
- 5'-CCGCUUCACCAAAAGUUAGAACUUGAGUGAAGGUGG-3'(서열번호 42),
- 5'-CCGCUUCACCAAAAGCUUAGGAACUUGAGUGAAGGUGG-3'(서열번호 43),
- 5'-CCGCUUCACCAAAAGCUUUAGAGAACUUGAGUGAAGGUGG-3'(서열번호 44),
- 5'-CCGCUUCACCAAAAGCUGUUAGUUAGAACUUGAGUGAAGGUGG-3'(서열번호 45),
- 5'-CCGCUUCACCAAAAGCUGUUAGUUAGAACUUGAGUGAAGGUGG-3'

(서열번호 46),

5'-CCGCUUCACCAAAAGCUGUUUAGAUUAGAACUUGAGUGAAGGUGG-3'(서열번호 47),

5'-CCGCUUCACCAAAAGCUGUCUUAGGAUUAGAACUUGAGUGAAGGUGG-3'(서열번호 48),

5'-CCGCUUCACCAAAAGCUGUCCUUAGGGAUUAGAACUUGAGUGAAGGUGG-3'(서열번호 49), 및

5'-CCGCUUCACCAAAAGCUGUCCCUUAGGGGAUUAGAACUUGAGUGAAGGUGG-3'(서열번호 10)로 이루어진 군에서 선택된 서열,

5'-GCUGCUUGCAUCAGCCUAAUGUCGAGAAGUGCUUUCUUCGGAAAGUAACCCUCGA-3'(서열번호 11), 및

5'-AACAAA-3', 5'-AACAAAU-3', 5'-AACAAAUU-3', 5'-AACAAAUUC-3',

5'-AACAAAUUCA-3'(서열번호 66), 5'-AACAAAUUCAU-3'(서열번호 67),

5'-AACAAAUUCAUU-3'(서열번호 68), 및

5'-AACAAAUUCAUUU-3'(서열번호 12)로 이루어진 군에서 선택된

서열이 연결된 엔지니어링 된 *tracrRNA*; 및

5'-GGA-3', 5'-AGGA-3', 5'-AAGGA-3', 5'-GAAGGA-3', 5'-UGAAGGA-3',

5'-AUGAAGGA-3', 5'-AAUGAAGGA-3', 및

5'-GAAUGAAGGA-3'(서열번호 14)으로 이루어진 군에서 선택된 서열, 및

5'-AUGCAAC-3'가 연결된 엔지니어링 된 *crRNA* 반복 서열 부분,

이때, 상기 엔지니어링 된 *crRNA* 반복 서열 부분의 3'말단은 상기

스페이서의 5'말단과 연결 되어 있으며,

상기 엔지니어링 된 *tracrRNA*의 서열이

5'-CUUCACUGAUAAAGUGGAGAACCGCUUCACCAAAAGCUGUCCC

UUAGGGGAUUAGAACUUGAGUGAAGGUGGGCUGCUUGCAUCAGC

CUAAUGUCGAGAAGUGCUUUCUUCGGAAAGUAACCCUCGAAACAA

AUUCAUUU-3'(서열번호 1)과 동일하고, 및 상기 엔지니어링 된 *crRNA*

반복 서열이 5'-GAAUGAAGGAAUGCAAC-3'(서열번호 3)과 동일한

경우는 제외되는 것을 특징으로 함.

[청구항 15] 다음을 포함하는, 엔지니어링 된 CRISPR/Cas12f1 복합체:

Cas12f1 단백질; 및

엔지니어링 된 가이드 RNA,

이때, 상기 엔지니어링 된 가이드 RNA는 다음을 포함함:

엔지니어링 된 스캐폴드 영역; 및

스페이서;

이때, 상기 엔지니어링 된 가이드 RNA는 5'말단에서 3'말단 방향으로,

엔지니어링 된 스캐폴드 영역, 및 스페이서가 순서대로 연결되어 있고,

상기 스페이서는 10개 이상 50개 이하의 뉴클레오타이드를 포함하며,

표적 서열과 상보적인 서열을 가지고,

상기 엔지니어링 된 스캐폴드 영역의 서열은

5'-CUUCACUGAUAAAGUGGAGAACCGCUUCACCAAAAGCUGUCCC
UUAGGGGAUUAGAACUUGAGUGAAGGUGGGCUGCUUGCAUCAGC
CUAAUGUCGAGAAGUGCUUUCUUCGGAAAGUAACCCUCGAAACAA
AUUCAUUUGAAAGAAUGAAGGAAUGCAAC-3'(서열번호 7)과 상이한
것을 특징으로 하며,

상기 엔지니어링 된 스캐폴드 영역의 서열은 5'말단에서 3'말단 방향으로
다음 서열이 순서대로 연결된 것임:

5'-A-3', 5'-AA-3', 5'-GAA-3', 5'-AGAA-3', 5'-GAGAA-3', 5'-GGAGAA-3',
5'-UGGAGAA-3', 5'-GUGGAGAA-3', 5'-AGUGGAGAA-3',
5'-AAGUGGAGAA-3'(서열번호 16), 5'-AAAGUGGAGAA-3'(서열번호 17),
5'-UAAAGUGGAGAA-3'(서열번호 18),
5'-AUAAAGUGGAGAA-3'(서열번호 19),
5'-GAUAAAGUGGAGAA-3'(서열번호 20),
5'-UGAUAAAGUGGAGAA-3'(서열번호 21),
5'-CUGAUAAAGUGGAGAA-3'(서열번호 22),
5'-ACUGAUAAAGUGGAGAA-3'(서열번호 23),
5'-CACUGAUAAAGUGGAGAA-3'(서열번호 24),
5'-UCACUGAUAAAGUGGAGAA-3'(서열번호 25),
5'-UUCACUGAUAAAGUGGAGAA-3'(서열번호 26), 및
5'-CUUCACUGAUAAAGUGGAGAA-3'(서열번호 9)로 이루어진 군에서
선택된 서열;

5'-CCGCUUCACUUGAGAGUGAAGGUGG-3'(서열번호 430),
5'-CCGCUUCACCUUAGGAGUGAAGGUGG-3'(서열번호 431),
5'-CCGCUUCACCAUUGAGAGUGAAGGUGG-3'(서열번호 38),
5'-CCGCUUCACCAAUUGAGAGUGAAGGUGG-3'(서열번호 39),
5'-CCGCUUCACCAAAUUGAGAGUGAAGGUGG-3'(서열번호 40),
5'-CCGCUUCACCAAAAUUGAGAGUGAAGGUGG-3'(서열번호
41),
5'-CCGCUUCACCAAAAGUUGAGAGUGAAGGUGG-3'(서열번
호 42),
5'-CCGCUUCACCAAAAGCUUGAGAGUGAAGGUGG-3'(서열
번호 43),
5'-CCGCUUCACCAAAAGCUUUGAGAGUGAAGGUGG-3'(서
열번호 44),
5'-CCGCUUCACCAAAAGCUGUUGAGAGUGAAGGUGG
-3'(서열번호 45),

5'-CCGCUUCACCAAAAAGCUGUUAGUAGAACUUGAGUGAAGGUGG-3'
(서열번호 46),
5'-CCGCUUCACCAAAAAGCUGUUUAGAUUAGAACUUGAGUGAAGGUGG-3'(서열번호 47),
5'-CCGCUUCACCAAAAAGCUGUCUUAGGAUUAGAACUUGAGUGAAGGUGG-3'(서열번호 48),
5'-CCGCUUCACCAAAAAGCUGUCCUUAGGGAUUAGAACUUGAGUGAAGGUGG-3'(서열번호 49), 및
5'-CCGCUUCACCAAAAAGCUGUCCCUUAGGGGAUUAGAACUUGAGUGAAGGUGG-3'(서열번호 10)로 이루어진 군에서 선택된 서열;
5'-GCUGCUUGCAUCAGCCUAAUGUCGAGAAGUGCUUUCUUCGGAAAGUAACCCUCGA-3'(서열번호 11);
5'-AACAAAGAAAGGA-3'(서열번호 110),
5'-AACAAUUGAAAAGGA-3'(서열번호 111),
5'-AACAAUUGAAAAAGGA-3'(서열번호 112),
5'-AACAAUUCGAAAGAAGGA-3'(서열번호 113),
5'-AACAAUUCAGAAAUGAAGGA-3'(서열번호 114),
5'-AACAAUUCAUGAAAUGAAGGA-3'(서열번호 115),
5'-AACAAUUCAUUGAAAAUGAAGGA-3'(서열번호 116), 및
5'-AACAAUUCAUUUGAAAGAUGAAGGA-3'(서열번호 117)에서 선택된 서열; 및
5'-AUGCAAC-3'.

[청구항 16] 제15 항에 있어서, 상기 엔지니어링 된 가이드 RNA에 포함된 상기 스캐폴드 영역의 서열은 5'말단에서 3'말단 방향으로 다음 서열이 순서대로 연결된 것을 특징으로 하는 엔지니어링 된 CRISPR/Cas12f1 복합체:

5'-A-3';
5'-CCGCUUCACCAAAAAGCUGUCCCUUAGGGGAUUAGAACUUGAGUGAAGGUGG-3'(서열번호 10);
5'-GCUGCUUGCAUCAGCCUAAUGUCGAGAAGUGCUUUCUUCGGAAAGUAACCCUCGA-3'(서열번호 11);
5'-AACAAAGAAAGGA-3'(서열번호 110); 및
5'-AUGCAAC-3'.

[청구항 17] 제15 항에 있어서, 상기 엔지니어링 된 가이드 RNA에 포함된 상기 스캐폴드 영역의 서열은 5'말단에서 3'말단 방향으로 다음 서열이 순서대로 연결된 것을 특징으로 하는 엔지니어링 된 CRISPR/Cas12f1 복합체:

5'-A-3';

5'-CCGCUUCACUUAGAGUGAAGGUGG-3'(서열번호 430);
 5'-GCUGCUUGCAUCAGCCUAAUGUCGAGAAGUGCUUUCUUCGGAA
 AGUAACCCUCGA-3'(서열번호 11);
 5'-AACAAAGAAAGGA-3'(서열번호 110); 및
 5'-AUGCAAC-3'.

[청구항 18] 다음을 포함하는, 엔지니어링 된 CRISPR/Cas12f1 복합체:

Cas12f1 단백질; 및

제5항 내지 제13항 중 어느 한 항에 따른 엔지니어링 된 가이드 RNA.

[청구항 19] 다음을 포함하는, CRISPR/Cas12f1 시스템의 각 구성요소를 발현할 수 있는 벡터:

Cas12f1 단백질을 암호화하는 핵산 서열을 포함하는 제1 서열;

상기 제1 서열과 작동 가능하게 연결된 제1 프로모터 서열;

엔지니어링 된 가이드 RNA를 암호화하는 핵산 서열을 포함하는 제2 서열; 및

상기 제2 서열과 작동 가능하게 연결된 제2 프로모터 서열,

이때, 상기 엔지니어링 된 가이드 RNA는 다음을 포함함:

엔지니어링 된 스캐폴드 영역; 및

스페이서;

이때, 상기 엔지니어링 된 가이드 RNA는 5'말단에서 3'말단 방향으로, 엔지니어링 된 스캐폴드 영역, 및 스페이서가 순서대로 연결되어 있고, 상기 스페이서는 10개 이상 50개 이하의 뉴클레오타이드를 포함하며, 표적 서열과 상보적인 서열을 가지고,

상기 엔지니어링 된 스캐폴드 영역의 서열은

5'-CUUCACUGAUAAAGUGGAGAACCGCUUCACCAAAAGCUGUCCC
 UUAGGGGAUUAGAACUUGAGUGAAGGUGGGCUGCUUGCAUCAGC
 CUAAUGUCGAGAAGUGCUUUCUUCGGAAAGUAACCCUCGAAACAA
 AUUCAUUUGAAAGAAUGAAGGAAUGCAAC-3'(서열번호 7)과 상이한
 것을 특징으로 하며,

상기 엔지니어링 된 스캐폴드 영역의 서열은 5'말단에서 3'말단 방향으로 다음 서열이 순서대로 연결된 것임:

5'-A-3', 5'-AA-3', 5'-GAA-3', 5'-AGAA-3', 5'-GAGAA-3', 5'-GGAGAA-3',

5'-UGGAGAA-3', 5'-GUGGAGAA-3', 5'-AGUGGAGAA-3',

5'-AAGUGGAGAA-3'(서열번호 16), 5'-AAAGUGGAGAA-3'(서열번호 17),

5'-UAAAGUGGAGAA-3'(서열번호 18),

5'-AUAAGUGGAGAA-3'(서열번호 19),

5'-GAUAAGUGGAGAA-3'(서열번호 20),

5'-UGAUAAGUGGAGAA-3'(서열번호 21),

5'-CUGAUAAGUGGAGAA-3'(서열번호 22),

5'-ACUGAUAAAGUGGAGAA-3'(서열번호 23),
 5'-CACUGAUAAAGUGGAGAA-3'(서열번호 24),
 5'-UCACUGAUAAAGUGGAGAA-3'(서열번호 25),
 5'-UUCACUGAUAAAGUGGAGAA-3'(서열번호 26), 및
 5'-CUUCACUGAUAAAGUGGAGAA-3'(서열번호 9)로 이루어진 군에서
 선택된 서열;
 5'-CCGCUUCACUUAAGAGUGAAGGUGG-3'(서열번호 430),
 5'-CCGCUUCACCUUAGGAGUGAAGGUGG-3'(서열번호 431),
 5'-CCGCUUCACCAUUAAGUGAGUGAAGGUGG-3'(서열번호 38),
 5'-CCGCUUCACCAAUUAAGUAGUGAAGGUGG-3'(서열번호 39),
 5'-CCGCUUCACCAAAUUAAGCUUAGUGAAGGUGG-3'(서열번호 40),
 5'-CCGCUUCACCAAAAUAAGACUUGAGUGAAGGUGG-3'(서열번호
 41),
 5'-CCGCUUCACCAAAAAGUUAGAACUUGAGUGAAGGUGG-3'(서열번
 호 42),
 5'-CCGCUUCACCAAAAAGCUUAGGAACUUGAGUGAAGGUGG-3'(서열
 번호 43),
 5'-CCGCUUCACCAAAAAGCUUUAGAGAACUUGAGUGAAGGUGG-3'(서
 열번호 44),
 5'-CCGCUUCACCAAAAAGCUGUUAGUUAGAACUUGAGUGAAGGUGG
 -3'(서열번호 45),
 5'-CCGCUUCACCAAAAAGCUGUUAGUAGAACUUGAGUGAAGGUGG-3'
 (서열번호 46),
 5'-CCGCUUCACCAAAAAGCUGUUUAGAUUAGAACUUGAGUGAAGGU
 GG-3'(서열번호 47),
 5'-CCGCUUCACCAAAAAGCUGUCUUAGGAUUAGAACUUGAGUGAAG
 GUGG-3'(서열번호 48),
 5'-CCGCUUCACCAAAAAGCUGUCCUUAGGGAUUAGAACUUGAGUGA
 AGGUGG-3'(서열번호 49), 및
 5'-CCGCUUCACCAAAAAGCUGUCCCUUAGGGGAUUAGAACUUGAGU
 GAAGGUGG-3'(서열번호 10)로 이루어진 군에서 선택된 서열;
 5'-GCUGCUUGCAUCAGCCUAAUGUCGAGAAGUGCUUUCUUCGGAA
 AGUAACCCUCGA-3'(서열번호 11);
 5'-AACAAAGAAAGGA-3'(서열번호 110),
 5'-AACAAAUGAAAAGGA-3'(서열번호 111),
 5'-AACAAAUUGAAAAAGGA-3'(서열번호 112),
 5'-AACAAAUUCGAAAGAAGGA-3'(서열번호 113),
 5'-AACAAAUUCAGAAAUGAAGGA-3'(서열번호 114),

5'-AACAAAUUCAUGAAAAUGAAGGA-3'(서열번호 115),
 5'-AACAAAUUCAUUGAAAAUGAAGGA-3'(서열번호 116), 및
 5'-AACAAAUUCAUUUGAAAGAAUGAAGGA-3'(서열번호 117)에서
 선택된 서열; 및
 5'-AUGCAAC-3'.

- [청구항 20] 제19항에 있어서, 상기 엔지니어링 된 가이드 RNA에 포함된 상기 스캐폴드 영역의 서열은 5'말단에서 3'말단 방향으로 다음 서열이 순서대로 연결된 것을 특징으로 하는 벡터:
- 5'-A-3';
 5'-CCGCUUCACCAAAAGCUGUCCCUUAGGGGAUUAGAACUUGAGU
 GAAGGUGG-3'(서열번호 10);
 5'-GCUGCUUGCAUCAGCCUAAUGUCGAGAAGUGCUUUCUUCGGAA
 AGUAACCCUCGA-3'(서열번호 11);
 5'-AACAAAGAAAGGA-3'(서열번호 110); 및
 5'-AUGCAAC-3'.

- [청구항 21] 제19항에 있어서, 상기 엔지니어링 된 가이드 RNA에 포함된 상기 스캐폴드 영역의 서열은 5'말단에서 3'말단 방향으로 다음 서열이 순서대로 연결된 것을 특징으로 하는 벡터:
- 5'-A-3';
 5'-CCGCUUCACUUAAGAGUGAAGGUGG-3'(서열번호 430);
 5'-GCUGCUUGCAUCAGCCUAAUGUCGAGAAGUGCUUUCUUCGGAA
 AGUAACCCUCGA-3'(서열번호 11);
 5'-AACAAAGAAAGGA-3'(서열번호 110); 및
 5'-AUGCAAC-3'.

- [청구항 22] 제19항에 있어서, 상기 벡터는 플라스미드, 레트로바이러스, 렌티바이러스, 아데노바이러스, 아데노-연관 바이러스, 백시니아바이러스, 폭스바이러스 및 단순포진 바이러스로 구성된 군에서 선택되는 하나 이상인 것을 특징으로 하는 벡터.

- [청구항 23] 다음을 포함하는, CRISPR/Cas12f1 시스템의 각 구성요소를 발현할 수 있는 벡터:

Cas12f1 단백질을 암호화하는 핵산 서열을 포함하는 제1 서열;
 상기 제1 서열과 작동 가능하게 연결된 제1 프로모터 서열;
 제5항 내지 제13항 중 어느 한 항에 따른 엔지니어링 된 가이드 RNA를 암호화하는 핵산 서열을 포함하는 제2 서열; 및
 상기 제2 서열과 작동 가능하게 연결된 제2 프로모터 서열.

- [청구항 24] 다음을 포함하는, 세포 내에서 표적 핵산을 편집하는 방법:
 Cas12f1 단백질 또는 이를 암호화하는 핵산, 및 엔지니어링 된 가이드 RNA 또는 이를 암호화하는 핵산을 세포 내로 전달하는 것,

이로 인해 상기 세포 내에서 CRISPR/Cas12f1 복합체가 형성될 수 있으며, 이로 인해 상기 표적 핵산이 CRISPR/Cas12f1 복합체에 의해 편집될 수 있고,

상기 엔지니어링 된 가이드 RNA는 다음을 포함하는 것을 특징으로 함: 엔지니어링 된 스캐폴드 영역; 및

스페이서;

이때, 상기 엔지니어링 된 가이드 RNA는 5'말단에서 3'말단 방향으로, 엔지니어링 된 스캐폴드 영역, 및 스페이서가 순서대로 연결되어 있고, 상기 스페이서는 10개 이상 50개 이하의 뉴클레오타이드를 포함하며, 표적 서열과 상보적인 서열을 가지고,

상기 엔지니어링 된 스캐폴드 영역의 서열은

5'-CUUCACUGAUAAAGUGGAGAACCGCUUCACCAAAAGCUGUCCC
UUAGGGGAUUAGAACUUGAGUGAAGGUGGGCUGCUUGCAUCAGC
CUAAUGUCGAGAAGUGCUUUCUUCGGAAAGUAACCCUCGAAACAA
AUUCAUUUGAAAGAAUGAAGGAAUGCAAC-3'(서열번호 7)과 상이한
것을 특징으로 하며,

상기 엔지니어링 된 스캐폴드 영역의 서열은 5'말단에서 3'말단 방향으로 다음 서열이 순서대로 연결된 것임:

5'-A-3', 5'-AA-3', 5'-GAA-3', 5'-AGAA-3', 5'-GAGAA-3', 5'-GGAGAA-3',
5'-UGGAGAA-3', 5'-GUGGAGAA-3', 5'-AGUGGAGAA-3',
5'-AAGUGGAGAA-3'(서열번호 16), 5'-AAAGUGGAGAA-3'(서열번호 17),
5'-UAAAGUGGAGAA-3'(서열번호 18),
5'-AUAAGUGGAGAA-3'(서열번호 19),
5'-GAUAAGUGGAGAA-3'(서열번호 20),
5'-UGAUAAGUGGAGAA-3'(서열번호 21),
5'-CUGAUAAGUGGAGAA-3'(서열번호 22),
5'-ACUGAUAAGUGGAGAA-3'(서열번호 23),
5'-CACUGAUAAGUGGAGAA-3'(서열번호 24),
5'-UCACUGAUAAGUGGAGAA-3'(서열번호 25),
5'-UUCACUGAUAAGUGGAGAA-3'(서열번호 26), 및
5'-CUUCACUGAUAAGUGGAGAA-3'(서열번호 9)로 이루어진 군에서
선택된 서열;

5'-CCGCUUCACUAGAGUGAAGGUGG-3'(서열번호 430),
5'-CCGCUUCACCUAGGAGUGAAGGUGG-3'(서열번호 431),
5'-CCGCUUCACCAUAGUGAGUGAAGGUGG-3'(서열번호 38),
5'-CCGCUUCACCAAUAGUUGAGUGAAGGUGG-3'(서열번호 39),
5'-CCGCUUCACCAAAUAGCUUGAGUGAAGGUGG-3'(서열번호 40),
5'-CCGCUUCACCAAAAUAGACUUGAGUGAAGGUGG-3'(서열번호

41),
 5'-CCGCUUCACCAAAAAGUUAGAACUUGAGUGAAGGUGG-3'(서열번호 42),
 5'-CCGCUUCACCAAAAAGCUUAGGAACUUGAGUGAAGGUGG-3'(서열번호 43),
 5'-CCGCUUCACCAAAAAGCUUUAGAGAACUUGAGUGAAGGUGG-3'(서열번호 44),
 5'-CCGCUUCACCAAAAAGCUGUUAGUUAGAACUUGAGUGAAGGUGG-3'(서열번호 45),
 5'-CCGCUUCACCAAAAAGCUGUUAGUAGAACUUGAGUGAAGGUGG-3'(서열번호 46),
 5'-CCGCUUCACCAAAAAGCUGUUUAGAUUAGAACUUGAGUGAAGGUGG-3'(서열번호 47),
 5'-CCGCUUCACCAAAAAGCUGUCUUAGGAUUAGAACUUGAGUGAAGGUGG-3'(서열번호 48),
 5'-CCGCUUCACCAAAAAGCUGUCCUUAGGGAUUAGAACUUGAGUGAAGGUGG-3'(서열번호 49), 및
 5'-CCGCUUCACCAAAAAGCUGUCCCUUAGGGGAUUAGAACUUGAGUGAAGGUGG-3'(서열번호 10)로 이루어진 군에서 선택된 서열;
 5'-GCUGCUUGCAUCAGCCUAAUGUCGAGAAGUGCUUUCUUCGGAAAGUAACCCUCGA-3'(서열번호 11);
 5'-AACAAAGAAAGGA-3'(서열번호 110),
 5'-AACAAAUGAAAAGGA-3'(서열번호 111),
 5'-AACAAAUUGAAAAAGGA-3'(서열번호 112),
 5'-AACAAAUUCGAAAGAAGGA-3'(서열번호 113),
 5'-AACAAAUUCAGAAAUGAAGGA-3'(서열번호 114),
 5'-AACAAAUUCAUGAAAAUGAAGGA-3'(서열번호 115),
 5'-AACAAAUUCAUUGAAAAUGAAGGA-3'(서열번호 116), 및
 5'-AACAAAUUCAUUUGAAAGAAUGAAGGA-3'(서열번호 117)에서 선택된 서열; 및
 5'-AUGCAAC-3'.

- [청구항 25] 다음을 포함하는, 세포 내에서 표적 핵산을 편집하는 방법:
 Cas12f1 단백질 또는 이를 암호화하는 핵산, 및 엔지니어링 된 가이드 RNA 또는 이를 암호화하는 핵산을 세포 내로 전달하는 것,
 이로 인해 상기 세포 내에서 CRISPR/Cas12f1 복합체가 형성될 수 있으며,
 이로 인해 상기 표적 핵산이 CRISPR/Cas12f1 복합체에 의해 편집될 수 있고,
 상기 엔지니어링 된 가이드 RNA는 다음을 포함하는 것을 특징으로 함:

엔지니어링 된 스캐폴드 영역; 및
스페이서; 및

이때, 상기 엔지니어링 된 가이드 RNA는 5'말단에서 3'말단 방향으로,
엔지니어링 된 스캐폴드 영역, 및 스페이서가 순서대로 연결되어 있고,
상기 스페이서는 10개 이상 50개 이하의 뉴클레오타이드를 포함하며,
표적 서열과 상보적인 서열을 가지고,
상기 엔지니어링 된 스캐폴드 영역의 서열은

5'-CUUCACUGAUAAAGUGGAGAACCGCUUCACCAAAAGCUGUCCC
UUAGGGGAUUAGAACUUGAGUGAAGGUGGGCUGCUUGCAUCAGC
CUAAUGUCGAGAAGUGCUUUCUUCGGAAAGUAACCCUCGAAACAA
AUUCAUUUUUCCUCUCCAAUUCUGCACAAGAAAGUUGCAGAACCC
GAAUAGACGAAUGAAGGAAUGCAAC-3'(서열번호 315)과 상이한 것을
특징으로 하며,

상기 엔지니어링 된 스캐폴드 영역의 서열은 5'말단에서 3'말단 방향으로
다음 서열이 순서대로 연결된 것임:

5'-A-3', 5'-AA-3', 5'-GAA-3', 5'-AGAA-3', 5'-GAGAA-3', 5'-GGAGAA-3',
5'-UGGAGAA-3', 5'-GUGGAGAA-3', 5'-AGUGGAGAA-3',
5'-AAGUGGAGAA-3'(서열번호 16), 5'-AAAGUGGAGAA-3'(서열번호 17),
5'-UAAAGUGGAGAA-3'(서열번호 18),
5'-AUAAGUGGAGAA-3'(서열번호 19),
5'-GAUAAAGUGGAGAA-3'(서열번호 20),
5'-UGAUAAAGUGGAGAA-3'(서열번호 21),
5'-CUGAUAAAGUGGAGAA-3'(서열번호 22),
5'-ACUGAUAAAGUGGAGAA-3'(서열번호 23),
5'-CACUGAUAAAGUGGAGAA-3'(서열번호 24),
5'-UCACUGAUAAAGUGGAGAA-3'(서열번호 25),
5'-UUCACUGAUAAAGUGGAGAA-3'(서열번호 26), 및
5'-CUUCACUGAUAAAGUGGAGAA-3'(서열번호 9)로 이루어진 군에서
선택된 서열;
5'-CCGCUUCACUUAGAGUGAAGGUGG-3'(서열번호 430),
5'-CCGCUUCACCUUAGGAGUGAAGGUGG-3'(서열번호 431),
5'-CCGCUUCACCAUUAGUGAGUGAAGGUGG-3'(서열번호 38),
5'-CCGCUUCACCAAUUAGUUGAGUGAAGGUGG-3'(서열번호 39),
5'-CCGCUUCACCAAAUUAGCUUGAGUGAAGGUGG-3'(서열번호 40),
5'-CCGCUUCACCAAAAUUAGACUUGAGUGAAGGUGG-3'(서열번호
41),
5'-CCGCUUCACCAAAAGUUAGAACUUGAGUGAAGGUGG-3'(서열번
호 42),

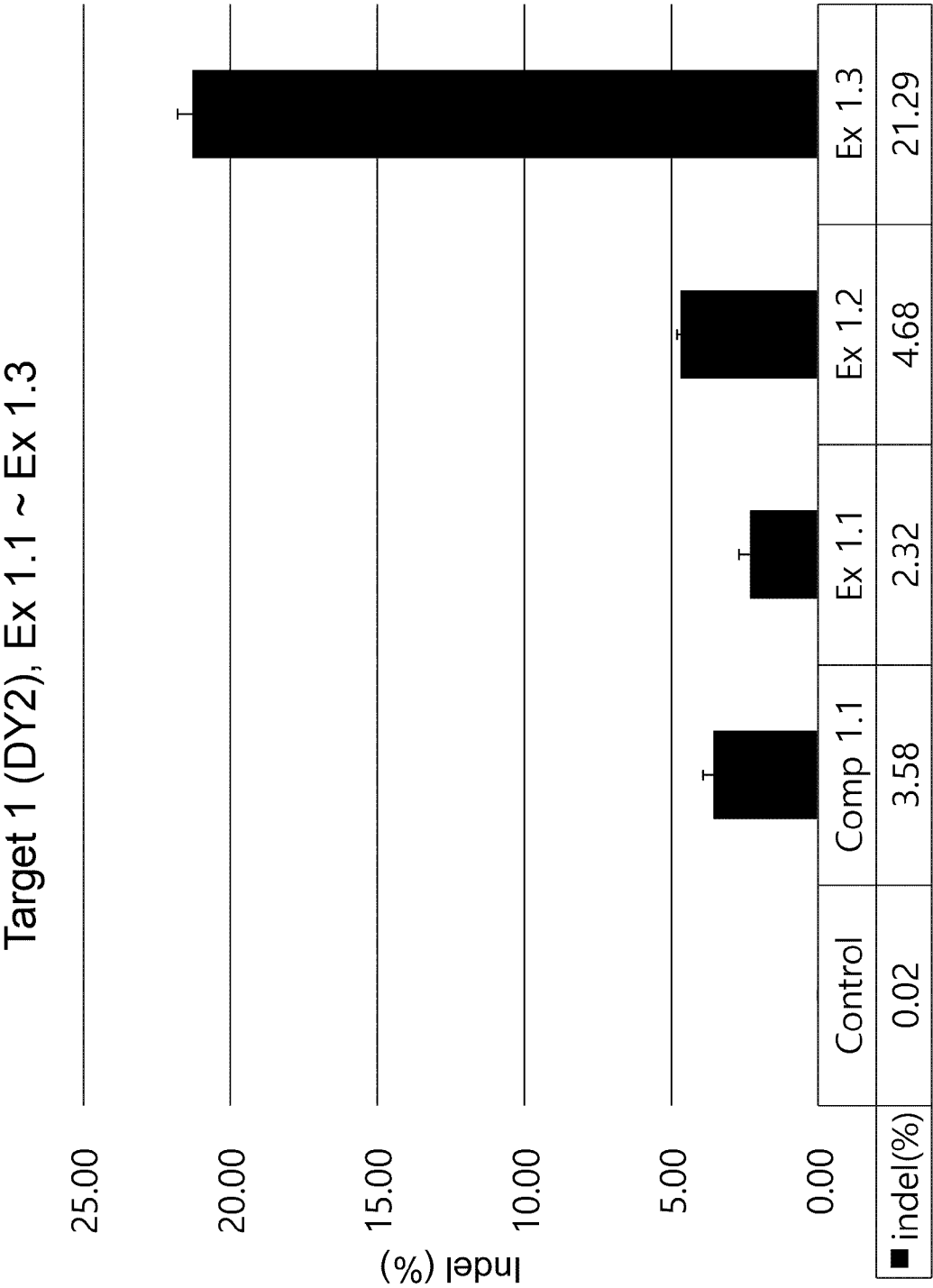
5'-CCGCUUCACCAAAAAGCUUAGGAACUUGAGUGAAGGUGG-3'(서열
 번호 43),
 5'-CCGCUUCACCAAAAAGCUUUAGAGAACUUGAGUGAAGGUGG-3'(서
 열번호 44),
 5'-CCGCUUCACCAAAAAGCUGUUAGUUAGAACUUGAGUGAAGGUGG
 -3'(서열번호 45),
 5'-CCGCUUCACCAAAAAGCUGUUAGUAGAACUUGAGUGAAGGUGG-3'
 (서열번호 46),
 5'-CCGCUUCACCAAAAAGCUGUUUAGAUUAGAACUUGAGUGAAGGU
 GG-3'(서열번호 47),
 5'-CCGCUUCACCAAAAAGCUGUCUUAGGAUUAGAACUUGAGUGAAG
 GUGG-3'(서열번호 48),
 5'-CCGCUUCACCAAAAAGCUGUCCUUAGGGAUUAGAACUUGAGUGA
 AGGUGG-3'(서열번호 49), 및
 5'-CCGCUUCACCAAAAAGCUGUCCCUUAGGGGAUUAGAACUUGAGU
 GAAGGUGG-3'(서열번호 10)로 이루어진 군에서 선택된 서열;
 5'-GCUGCUUGCAUCAGCCUAAUGUCGAGAAGUGCUUUCUUCGGAA
 AGUAACCCUCGA-3'(서열번호 11);
 5'-AACAAAGAAAGGA-3'(서열번호 110),
 5'-AACAAAUGAAAAGGA-3'(서열번호 111),
 5'-AACAAAUUGAAAAAGGA-3'(서열번호 112),
 5'-AACAAAUUCGAAAGAAGGA-3'(서열번호 113),
 5'-AACAAAUUCAGAAAUGAAGGA-3'(서열번호 114),
 5'-AACAAAUUCAUGAAAUGAAGGA-3'(서열번호 115),
 5'-AACAAAUUCAUUGAAAAUGAAGGA-3'(서열번호 116),
 5'-AACAAAUUCAUUUGAAAGAAUGAAGGA-3'(서열번호 117),
 5'-AACAAAUUCAUUUUGAAACGAAUGAAGGA-3'(서열번호 293),
 5'-AACAAAUUCAUUUUUGAAAACGAAUGAAGGA-3'(서열번호 294),
 5'-AACAAAUUCAUUUUUCGAAAGACGAAUGAAGGA-3'(서열번호
 295),
 5'-AACAAAUUCAUUUUUCCGAAAAGACGAAUGAAGGA-3'(서열번호
 296),
 5'-AACAAAUUCAUUUUUCCUGAAAUAGACGAAUGAAGGA-3'(서열번
 호 297),
 5'-AACAAAUUCAUUUUUCCUCGAAAAUAGACGAAUGAAGGA-3'(서
 열번호 298),
 5'-AACAAAUUCAUUUUUCCUCUGAAAAAUAGACGAAUGAAGGA-3'(서
 열번호 299),

5'-AACAAAUUCAUUUUUCCUCUCGAAAGAAUAGACGAAUGAAGGA-3'(서열번호 300),
 5'-AACAAAUUCAUUUUUCCUCUCCGAAACGAAUAGACGAAUGAAGGA-3'(서열번호 301),
 5'-AACAAAUUCAUUUUUCCUCUCCAGAAACCGAAUAGACGAAUGAAGGA-3'(서열번호 302),
 5'-AACAAAUUCAUUUUUCCUCUCCAAGAAACCCGAAUAGACGAAUGAAGGA-3'(서열번호 303),
 5'-AACAAAUUCAUUUUUCCUCUCCAUGAAAACCCGAAUAGACGAAUGAAGGA-3'(서열번호 304),
 5'-AACAAAUUCAUUUUUCCUCUCCA AUUGAAAAACCCGAAUAGACGAAUGAAGGA-3'(서열번호 305),
 5'-AACAAAUUCAUUUUUCCUCUCCA AUUCGAAAGAACCCGAAUAGACGAAUGAAGGA-3'(서열번호 306),
 5'-AACAAAUUCAUUUUUCCUCUCCA AUUCUGAAAAGAACCCGAAUAGACGAAUGAAGGA-3'(서열번호 307),
 5'-AACAAAUUCAUUUUUCCUCUCCA AUUCUGGAAACAGAACCCGAAUAGACGAAUGAAGGA-3'(서열번호 308),
 5'-AACAAAUUCAUUUUUCCUCUCCA AUUCUGCGAAAGCAGAACCCGAAUAGACGAAUGAAGGA-3'(서열번호 309),
 5'-AACAAAUUCAUUUUUCCUCUCCA AUUCUGCAGAAAUGCAGAACCCGAAUAGACGAAUGAAGGA-3'(서열번호 310),
 5'-AACAAAUUCAUUUUUCCUCUCCA AUUCUGCACGAAAUGCAGAACCCGAAUAGACGAAUGAAGGA-3'(서열번호 311),
 5'-AACAAAUUCAUUUUUCCUCUCCA AUUCUGCACAGAAAGUUGCAAGAACCCGAAUAGACGAAUGAAGGA-3'(서열번호 312),
 5'-AACAAAUUCAUUUUUCCUCUCCA AUUCUGCACAGAAAUGCAGAACCCGAAUAGACGAAUGAAGGA-3'(서열번호 313), 및
 5'-AACAAAUUCAUUUUUCCUCUCCA AUUCUGCACAAGAAAGUUGCAGAACCCGAAUAGACGAAUGAAGGA-3'(서열번호 314)로 이루어진 군에서 선택된 서열; 및
 5'-AUGCAAC-3'.

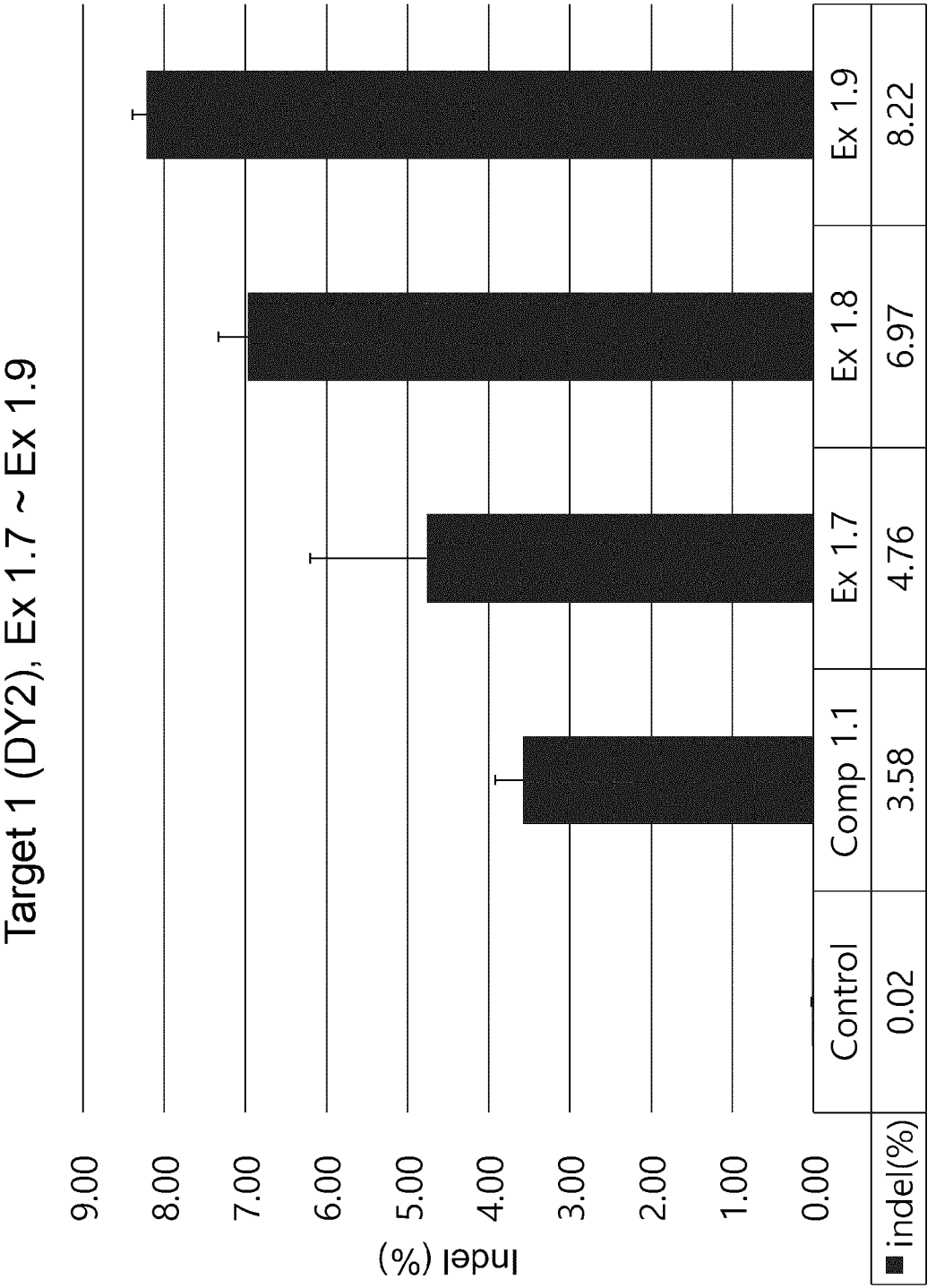
- [청구항 26] 제24항 또는 제25항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 전달은 상기 Cas12f1 단백질 및 상기 엔지니어링 된 가이드 RNA를 CRISPR/Cas12f1 복합체로써 세포 내에 주입하는 것인 방법.
- [청구항 27] 제24항에 있어서, 상기 전달은 상기 Cas12f1 단백질을 암호화하는 핵산 및 상기 엔지니어링 된 가이드 RNA를 암호화하는 핵산을 포함하는 벡터를 세포 내에 주입하는 것인 방법.

- [청구항 28] 제24항 또는 제25항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 세포는 진핵세포인 것을 특징으로 하는 방법.
- [청구항 29] 제27항에 있어서, 상기 벡터는 플라스미드, 레트로바이러스, 렌티바이러스, 아데노바이러스, 아데노-연관 바이러스, 백시니아바이러스, 폭스바이러스 및 단순포진 바이러스로 구성된 군에서 선택되는 하나 이상인 것을 특징으로 하는 벡터.
- [청구항 30] 다음을 포함하는, 세포 내에서 표적 핵산을 편집하는 방법:
Cas12f1 단백질 또는 이를 암호화하는 핵산, 및 제5항 내지 제13항 중 어느 한 항에 따른 엔지니어링 된 가이드 RNA 또는 이를 암호화하는 핵산을 세포 내로 전달하는 것,
이로 인해 상기 세포 내에서 CRISPR/Cas12f1 복합체가 형성될 수 있으며,
이로 인해 상기 표적 핵산이 CRISPR/Cas12f1 복합체에 의해 편집될 수 있음.
- [청구항 31] 제1항 또는 제2항 중 어느 한 항의 엔지니어링 된 가이드 RNA를 암호화하는 DNA.
- [청구항 32] 제5항 내지 제13항 중 어느 한 항의 엔지니어링 된 가이드 RNA를 암호화하는 DNA.
- [청구항 33] 제14항의 엔지니어링 된 가이드 RNA를 암호화하는 DNA.

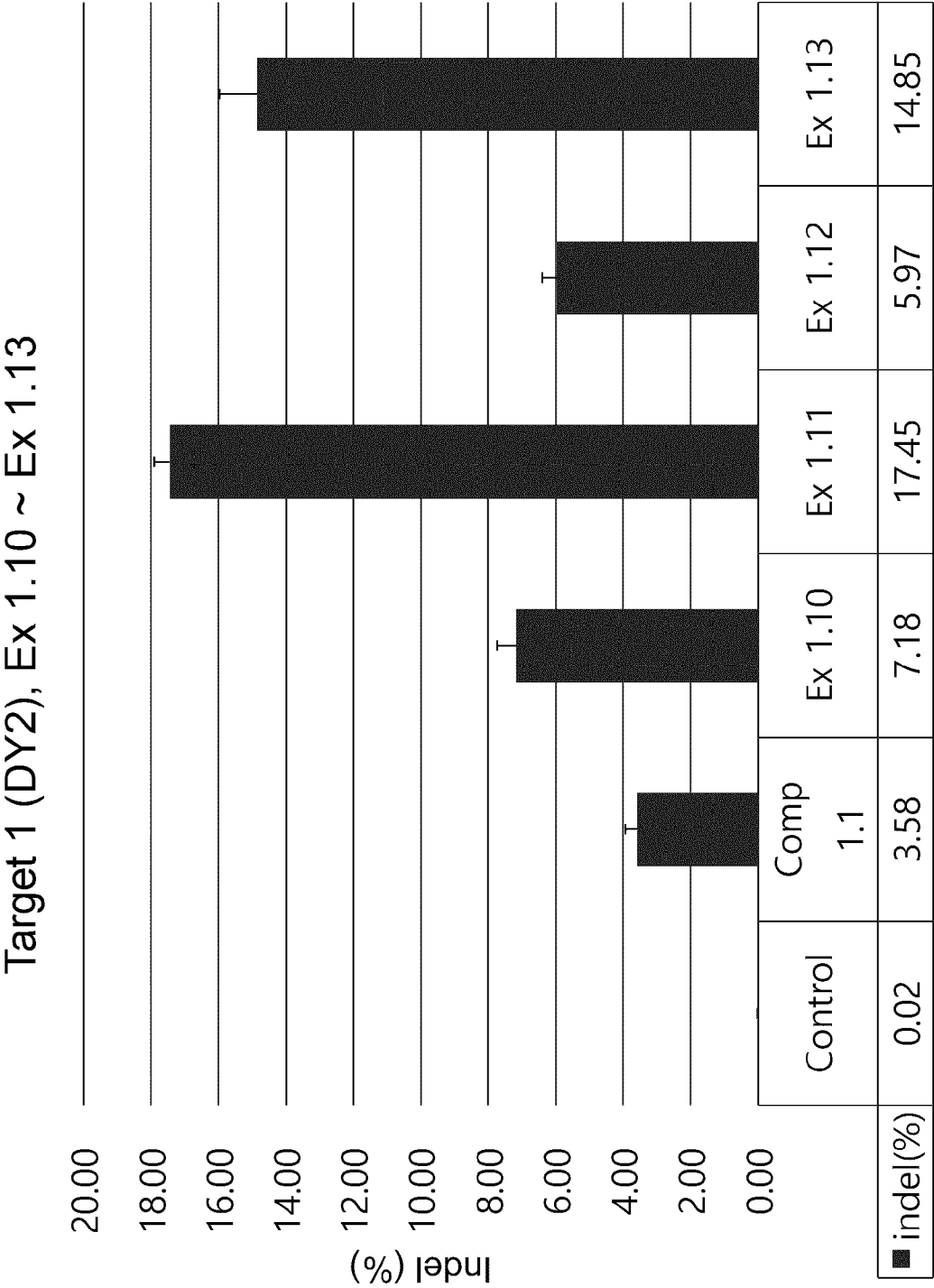
[도2]



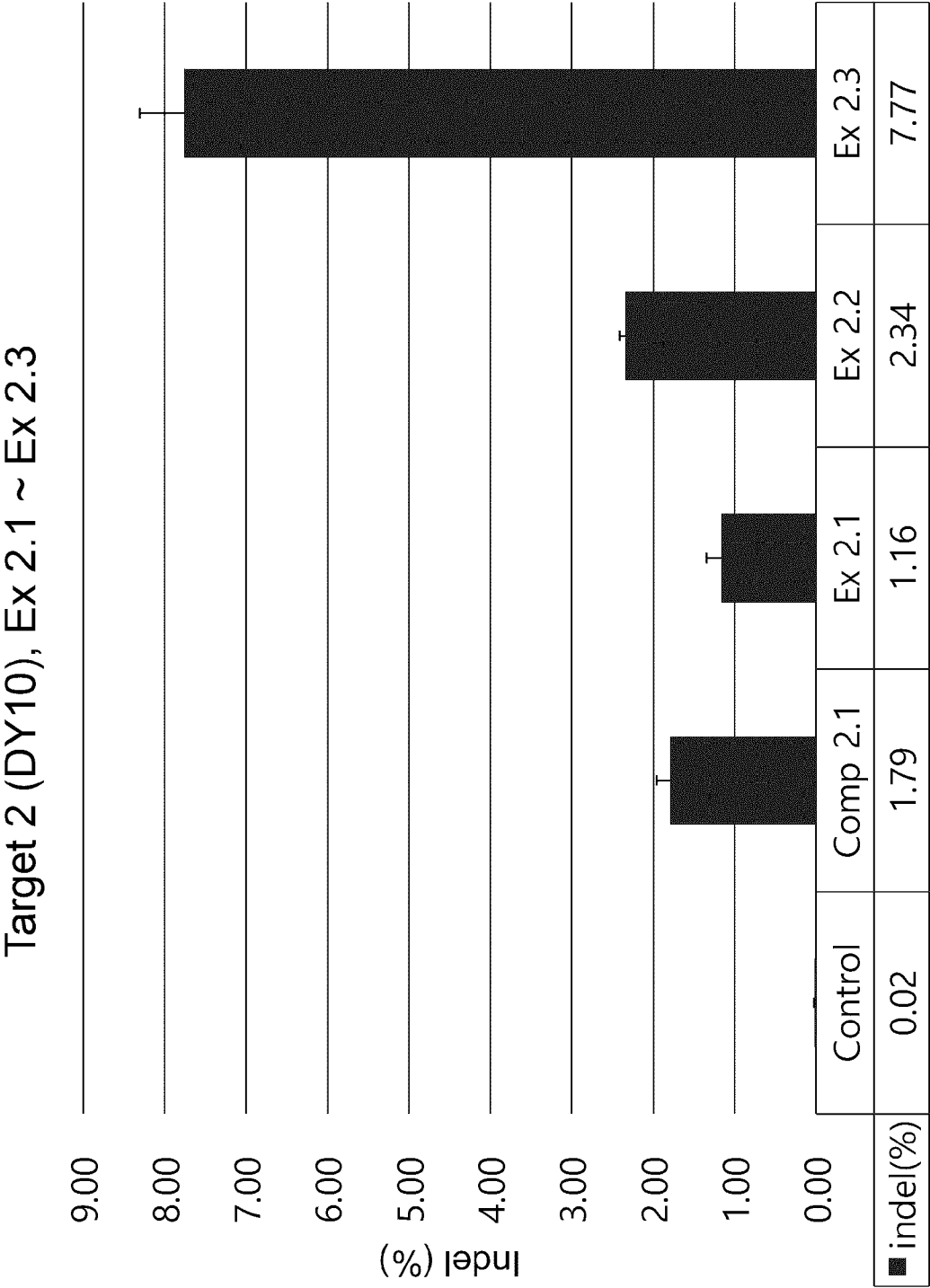
[도3]



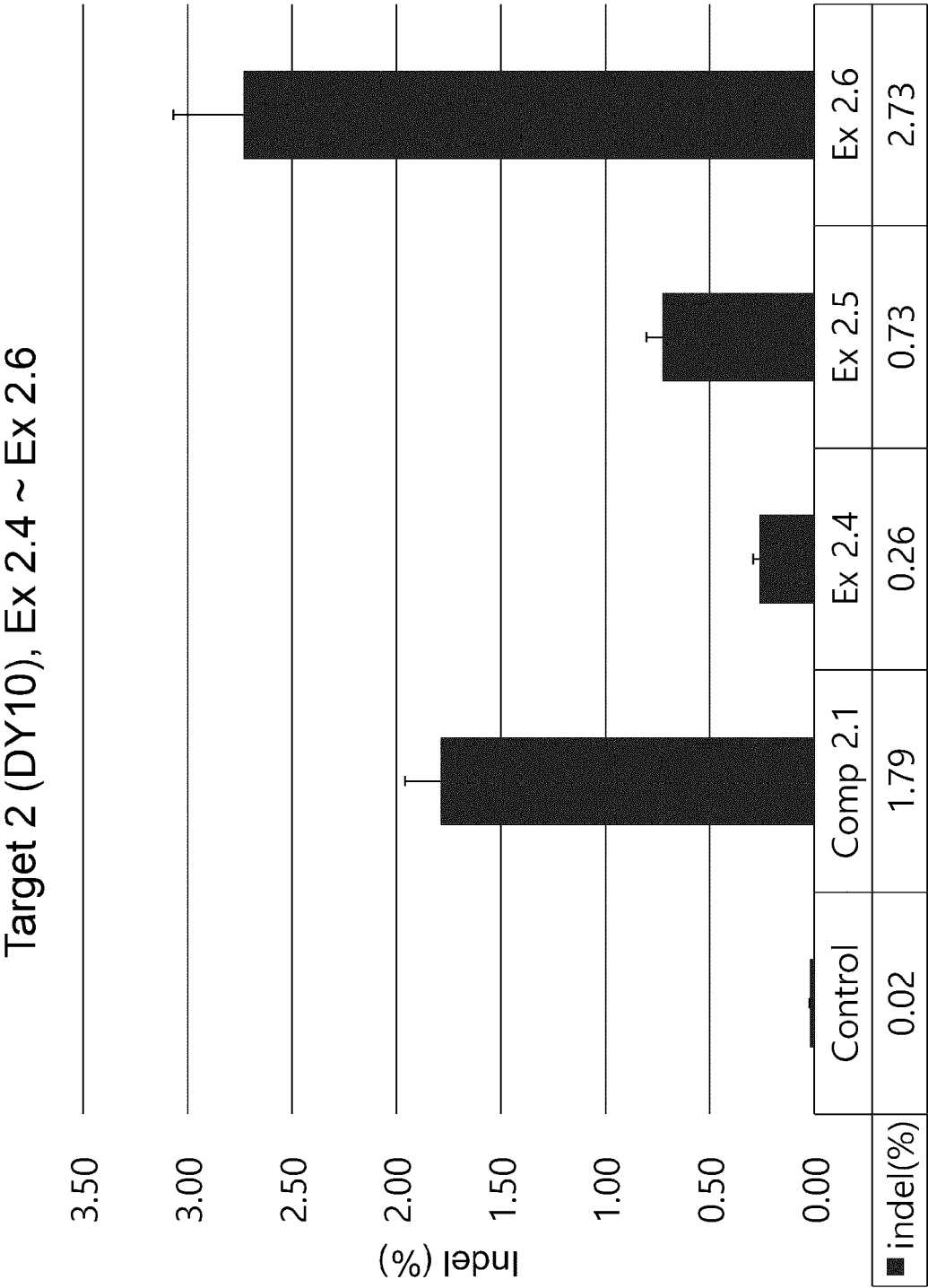
[도4]



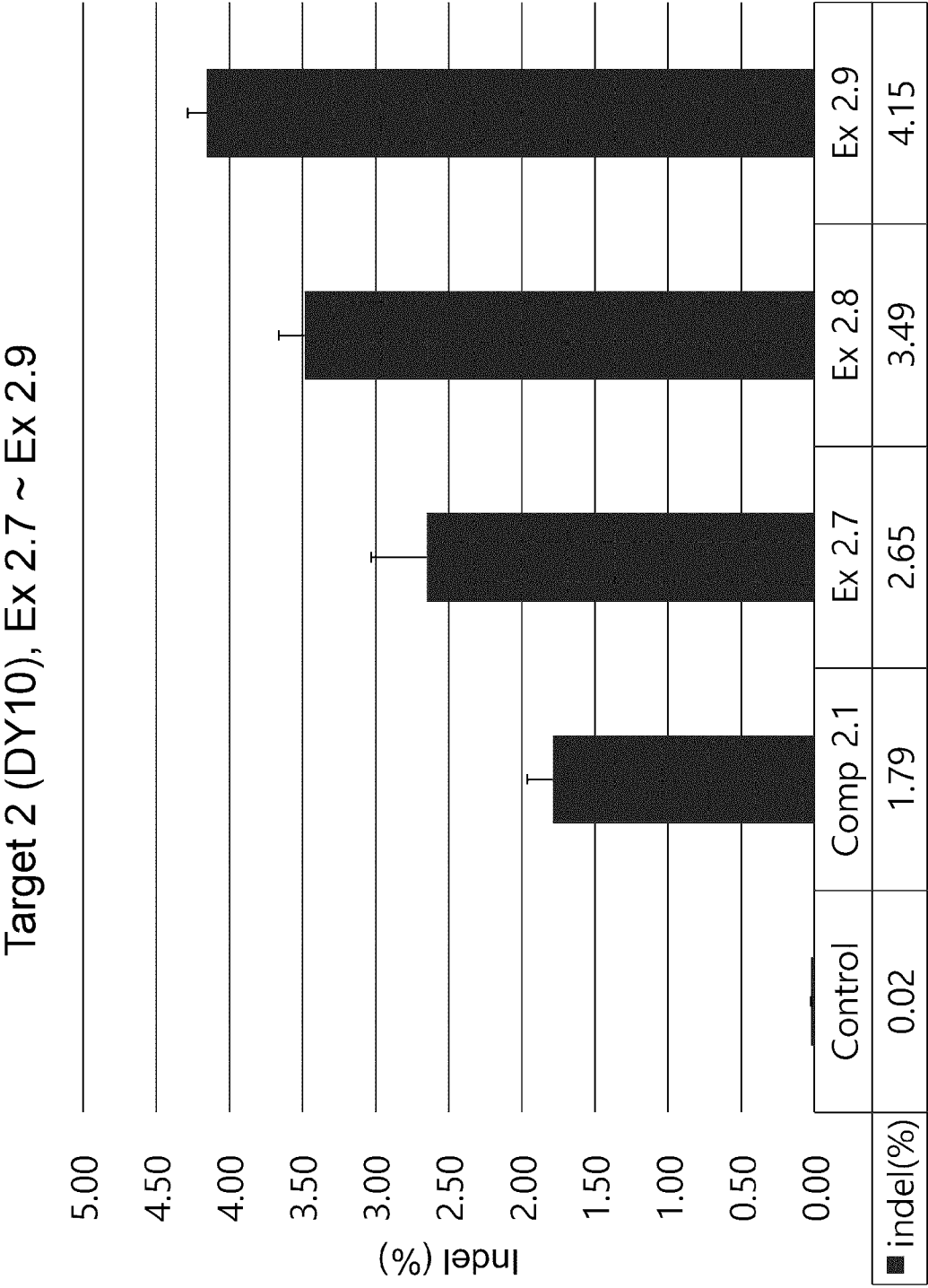
[도5]



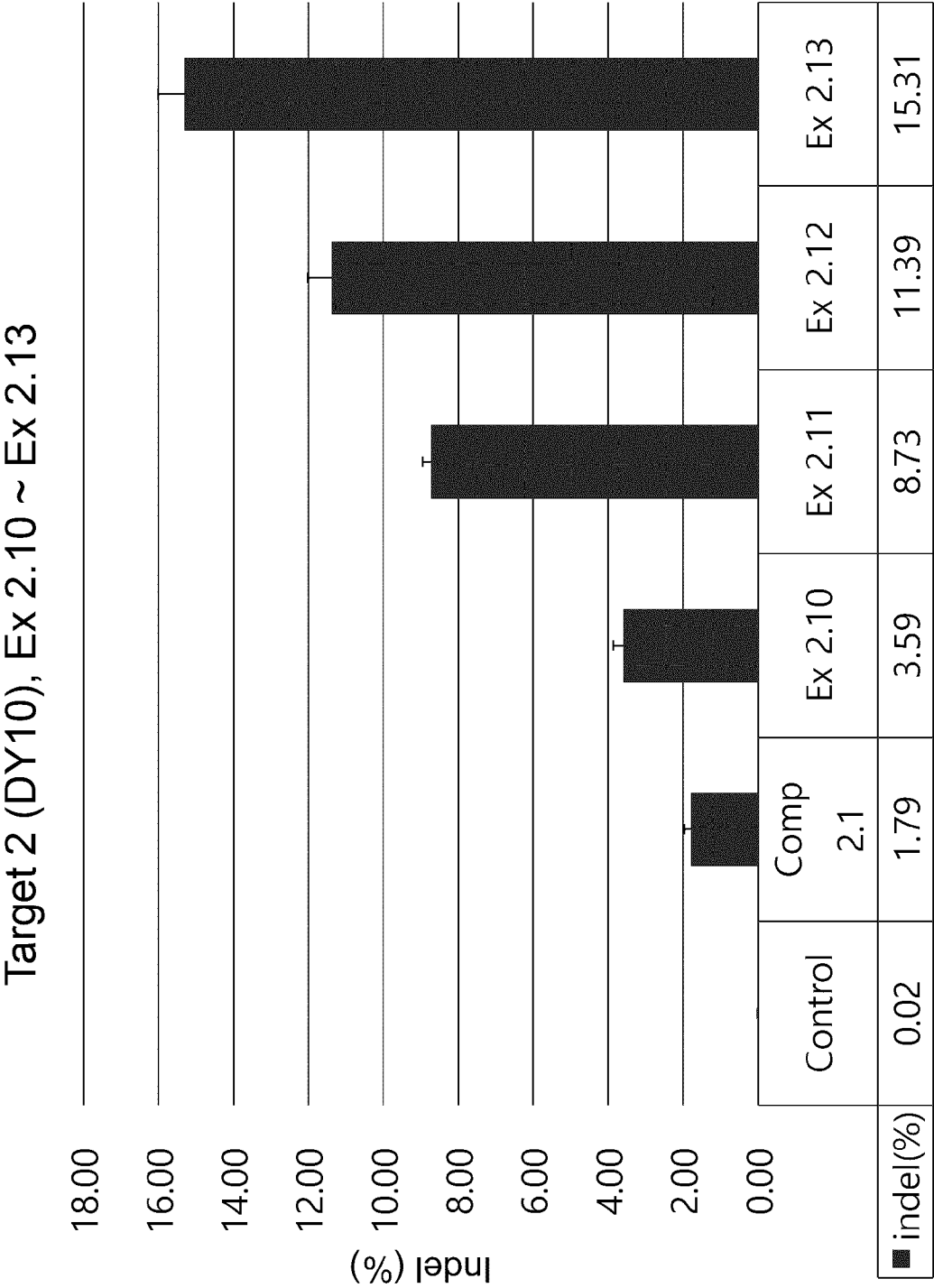
[도6]



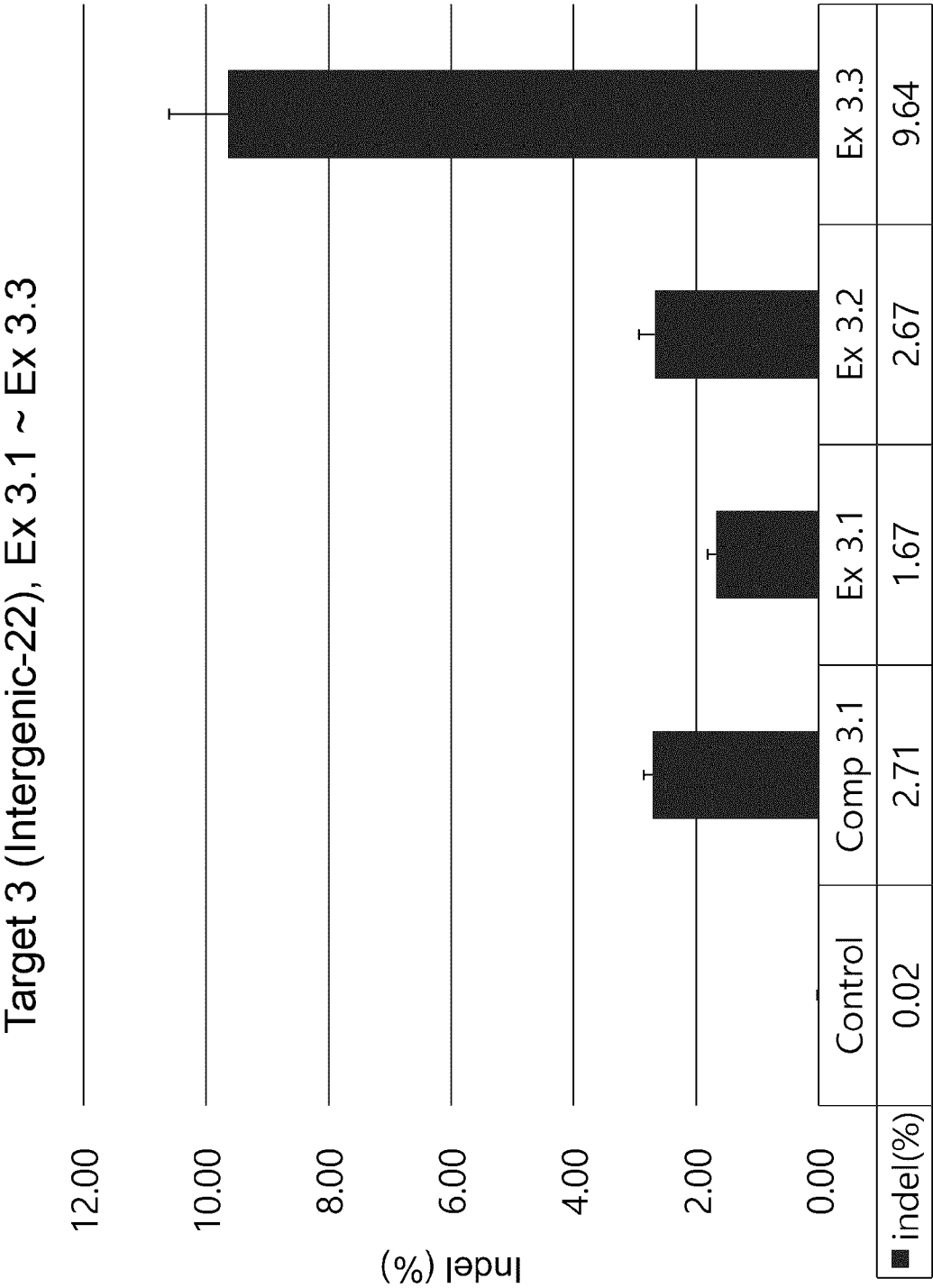
[도7]



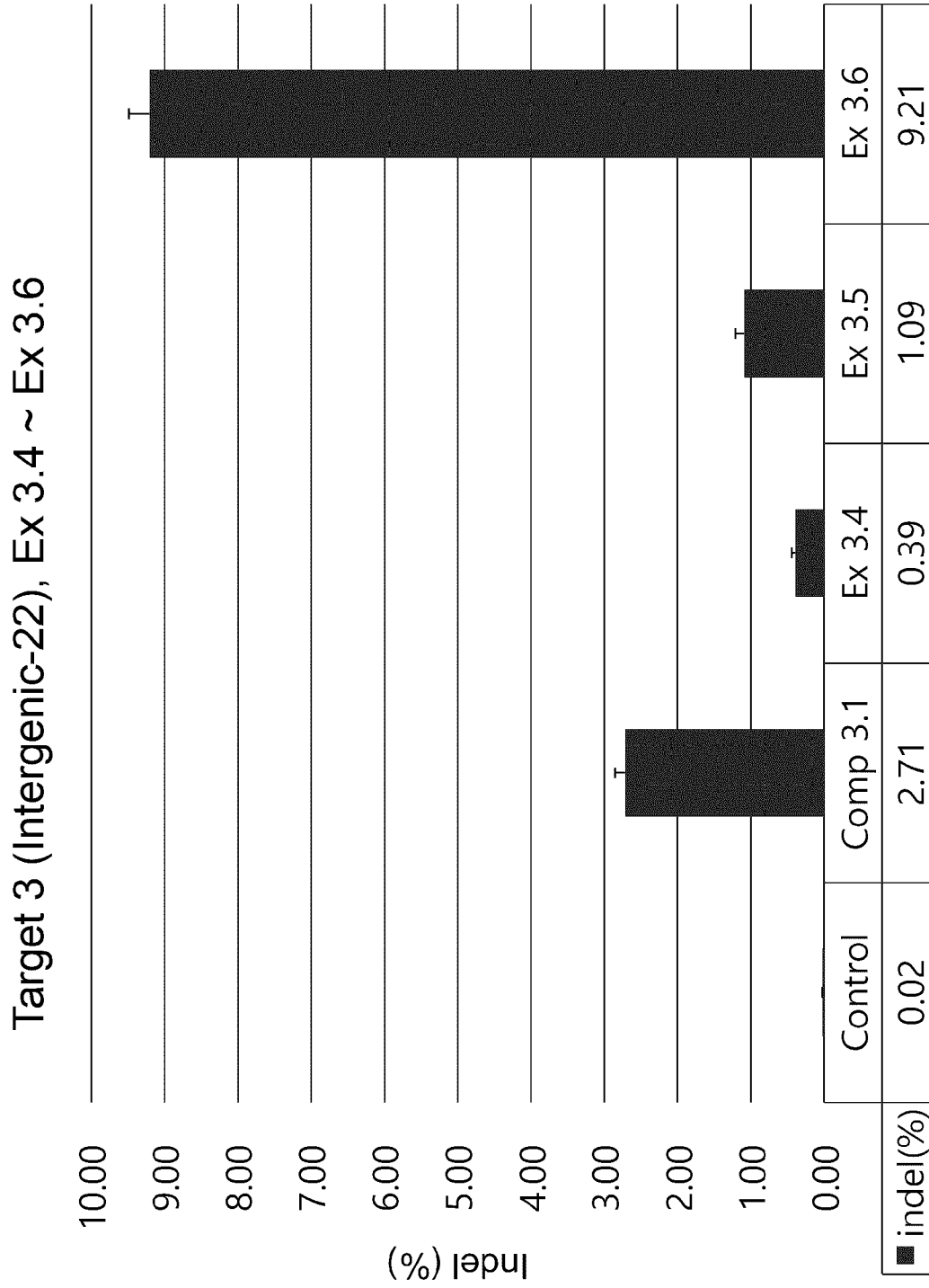
[도8]



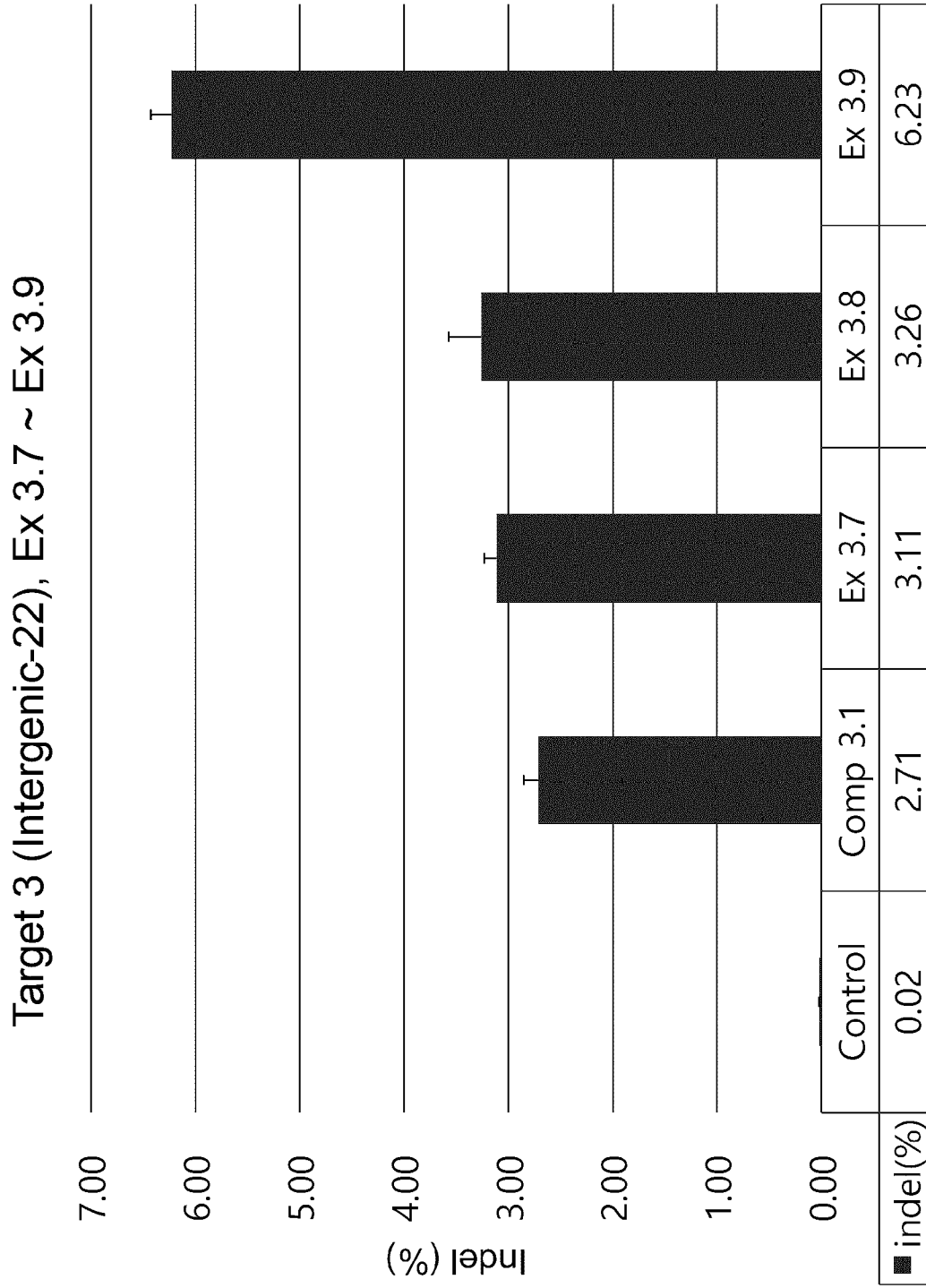
[도9]



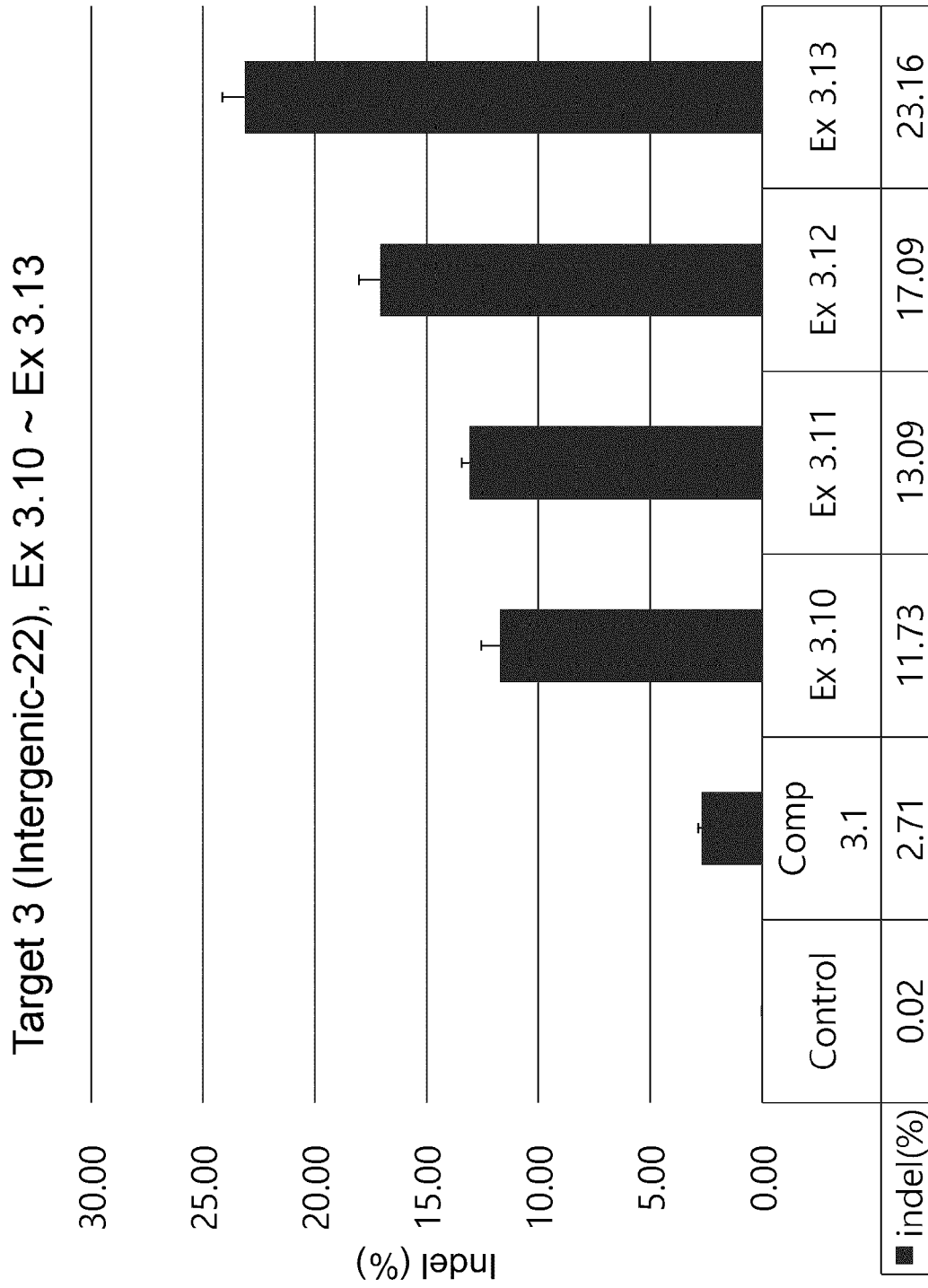
[도10]



[도11]

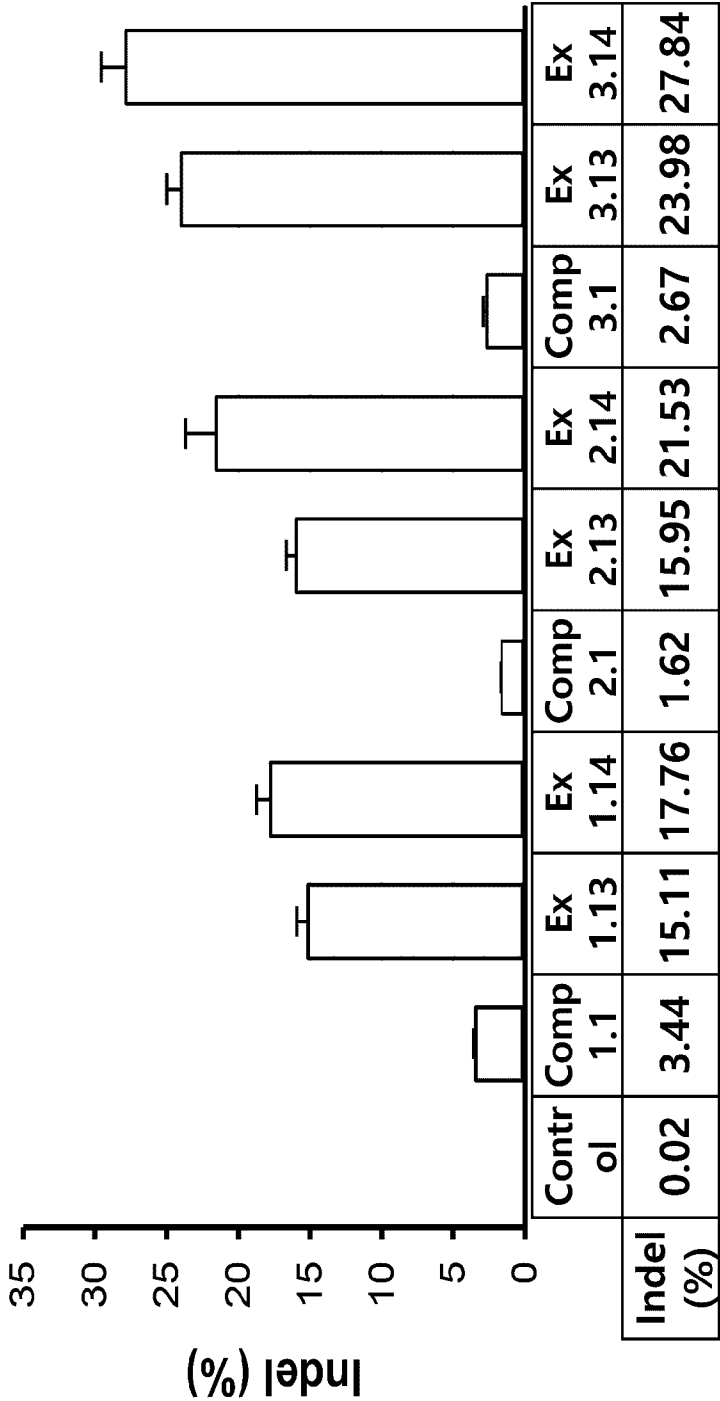


[도12]



[도13]

Example n.13 ~ n.14



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/KR2021/013923

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER C12N 15/113(2010.01)i; C12N 15/63(2006.01)i; C12N 9/22(2006.01)i; C12N 15/90(2006.01)i; C12N 15/10(2006.01)i According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
B. FIELDS SEARCHED Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) C12N 15/113(2010.01); C12N 15/11(2006.01); C12N 15/90(2006.01); C12N 9/22(2006.01) Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched Korean utility models and applications for utility models: IPC as above Japanese utility models and applications for utility models: IPC as above Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) eKOMPASS (KIPO internal) & keywords: CRISPR/Cas12f1, 가이드 RNA(guide RNA), 스캐폴드(scaffold), 스페이서(spacer)		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	US 2020-0172886 A1 (THE REGENTS OF THE UNIVERSITY OF CALIFORNIA) 04 June 2020 (2020-06-04) See claim 116; paragraphs [0043] and [0060]; SEQ ID NO: 357; table 5; and figures 16 and 19.	2,25,26,28,31
A		1,3-24,27,29,30,32,33
A	CN 111363763 A (HAINAN UNIVERSITY) 03 July 2020 (2020-07-03) See entire document.	1-33
A	US 2020-0190494 A1 (PIONEER HI-BRED INTERNATIONAL, INC.) 18 June 2020 (2020-06-18) See entire document.	1-33
A	KARVELIS, T. et al. PAM recognition by miniature CRISPR-Cas12f nucleases triggers programmable double-stranded DNA target cleavage. Nucleic Acids Research. (electronic publication)04 April 2020, vol. 48, no. 9, pp. 5016-5023. See entire document.	1-33
☒ Further documents are listed in the continuation of Box C. ☒ See patent family annex.		
* Special categories of cited documents: "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "D" document cited by the applicant in the international application "E" earlier application or patent but published on or after the international filing date "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art "&" document member of the same patent family		
Date of the actual completion of the international search 19 January 2022		Date of mailing of the international search report 19 January 2022
Name and mailing address of the ISA/KR Korean Intellectual Property Office Government Complex-Daejeon Building 4, 189 Cheongsaro, Seo-gu, Daejeon 35208 Facsimile No. +82-42-481-8578		Authorized officer Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/KR2021/013923**C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT**

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	HARRINGTON, L. B. et al. Programmed DNA destruction by miniature CRISPR-Cas14 enzymes. Science. 16 November 2018, vol. 362, pp. 839-842 (inner pp. 1-4). See entire document.	1-33
PX	KIM, D. Y. et al. Efficient CRISPR editing with a hypercompact Cas12f1 and engineered guide RNAs delivered by adeno-associated virus. Nature Biotechnology. 02 September 2021, chapters 1-9. See abstract; chapters 1-3 and 7; figure 1; and supplementary table 5.	1-3,5-7,15,16, 18-20,22-32

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/KR2021/013923

Box No. I **Nucleotide and/or amino acid sequence(s) (Continuation of item 1.c of the first sheet)**

1. With regard to any nucleotide and/or amino acid sequence disclosed in the international application, the international search was carried out on the basis of a sequence listing:
- a. ☒ forming part of the international application as filed:
- ☒ in the form of an Annex C/ST.25 text file.
- ☐ on paper or in the form of an image file.
- b. ☐ furnished together with the international application under PCT Rule 13*ter*.1(a) for the purposes of international search only in the form of an Annex C/ST.25 text file.
- c. ☐ furnished subsequent to the international filing date for the purposes of international search only:
- ☐ in the form of an Annex C/ST.25 text file (Rule 13*ter*.1(a)).
- ☐ on paper or in the form of an image file (Rule 13*ter*.1(b) and Administrative Instructions, Section 713).
2. ☐ In addition, in the case that more than one version or copy of a sequence listing has been filed or furnished, the required statements that the information in the subsequent or additional copies is identical to that forming part of the application as filed or does not go beyond the application as filed, as appropriate, were furnished.
3. Additional comments:

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.

PCT/KR2021/013923

Patent document cited in search report			Publication date (day/month/year)	Patent family member(s)			Publication date (day/month/year)
US	2020-0172886	A1	04 June 2020	AU	2018-358051	A1	14 May 2020
				BR	112020008654	A2	10 November 2020
				CA	3080493	A1	09 May 2019
				CN	111886336	A	03 November 2020
				EP	3704239	A1	09 September 2020
				EP	3704239	A4	18 August 2021
				GB	2582482	A	23 September 2020
				JP	2021-503278	A	12 February 2021
				KR	10-2020-0091858	A	31 July 2020
				SG	11202003863	A	28 May 2020
				US	11180743	B2	23 November 2021
				US	2020-0087640	A1	19 March 2020
				US	2020-0299660	A1	24 September 2020
				US	2020-0370028	A1	26 November 2020
				US	2021-0017508	A1	21 January 2021
				WO	2019-089820	A1	09 May 2019

CN	111363763	A	03 July 2020	None			

US	2020-0190494	A1	18 June 2020	AU	2019-398351	A1	03 June 2021
				CA	3117228	A1	18 June 2020
				CN	113166744	A	23 July 2021
				EP	3894550	A2	20 October 2021
				KR	10-2021-0104068	A	24 August 2021
				US	10934536	B2	02 March 2021
				US	2021-0139874	A1	13 May 2021
				US	2021-0163908	A1	03 June 2021
				WO	2020-123887	A2	18 June 2020
WO	2020-123887	A3	16 July 2020				

A. 발명이 속하는 기술분류(국제특허분류(IPC)) C12N 15/113(2010.01)i; C12N 15/63(2006.01)i; C12N 9/22(2006.01)i; C12N 15/90(2006.01)i; C12N 15/10(2006.01)i		
B. 조사된 분야 조사된 최소문헌(국제특허분류를 기재) C12N 15/113(2010.01); C12N 15/11(2006.01); C12N 15/90(2006.01); C12N 9/22(2006.01) 조사된 기술분야에 속하는 최소문헌 이외의 문헌 한국등록실용신안공보 및 한국공개실용신안공보: 조사된 최소문헌란에 기재된 IPC 일본등록실용신안공보 및 일본공개실용신안공보: 조사된 최소문헌란에 기재된 IPC 국제조사에 이용된 전산 데이터베이스(데이터베이스의 명칭 및 검색어(해당하는 경우)) eKOMPASS(특허청 내부 검색시스템) & 키워드: CRISPR/Cas12f1, 가이드 RNA(guide RNA), 스캐폴드(scaffold), 스페이서(spacer)		
C. 관련 문헌		
카테고리*	인용문헌명 및 관련 구절(해당하는 경우)의 기재	관련 청구항
X A	US 2020-0172886 A1 (THE REGENTS OF THE UNIVERSITY OF CALIFORNIA) 2020.06.04 청구항 116; 단락 [0043], [0060]; 서열번호 357; 표 5; 도면 16, 19	2,25,26,28,31 1,3-24,27,29,30,32,33
A	CN 111363763 A (HAINAN UNIVERSITY) 2020.07.03 전체 문헌	1-33
A	US 2020-0190494 A1 (PIONEER HI-BRED INTERNATIONAL, INC.) 2020.06.18 전체 문헌	1-33
A	KARVELIS, T. 등, 'PAM recognition by miniature CRISPR-Cas12f nucleases triggers programmable double-stranded DNA target cleavage', Nucleic Acids Research, (전자공개)2020.04.04, 48권, 9호, 5016-5023 페이지 전체 문헌	1-33
A	HARRINGTON, L. B. 등, 'Programmed DNA destruction by miniature CRISPR-Cas14 enzymes', Science, 2018.11.16, 362권, 839-842 페이지(내부 페이지 1-4) 전체 문헌	1-33
☒ 추가 문헌이 C(계속)에 기재되어 있습니다. ☒ 대응특허에 관한 별지를 참조하십시오.		
* 인용된 문헌의 특별 카테고리: "A" 특별히 관련이 없는 것으로 보이는 일반적인 기술수준을 정의한 문헌 "D" 본 국제출원에서 출원인이 인용한 문헌 "E" 국제출원일보다 빠른 출원일 또는 우선일을 가지나 국제출원일 이후에 공개된 선출원 또는 특허 문헌 "L" 우선권 주장에 의문을 제기하는 문헌 또는 다른 인용문헌의 공개일 또는 다른 특별한 이유(이유를 명시)를 밝히기 위하여 인용된 문헌 "O" 구두 개시, 사용, 전시 또는 기타 수단을 언급하고 있는 문헌 "P" 우선일 이후에 공개되었으나 국제출원일 이전에 공개된 문헌		
국제조사의 실제 완료일 2022년01월19일(19.01.2022)		국제조사보고서 발송일 2022년01월19일(19.01.2022)
ISA/KR의 명칭 및 우편주소 대한민국 특허청 (35208) 대전광역시 서구 청사로 189, 4동 (둔산동, 정부대전청사) 팩스 번호 +82-42-481-8578		심사관 허주형 전화번호 +82-42-481-5373

C. 관련 문헌

카테고리*	인용문헌명 및 관련 구절(해당하는 경우)의 기재	관련 청구항
PX	KIM, D. Y. 등, 'Efficient CRISPR editing with a hypercompact Cas12f1 and engineered guide RNAs delivered by adeno-associated virus', Nature Biotechnology, 2021.09.02, 1-9 장 초록; 1-3, 7장; 도면 1; 보충 표 5	1-3,5-7,15,16, 18-20,22-32

제1기재란 핵산염기 및/또는 아미노산 서열(첫 번째 용지의 1.c의 계속)

1. 국제출원에 개시된 핵산염기 및/또는 아미노산 서열과 관련하여, 국제조사는 다음에 기초하여 수행되었습니다.

- a. ☒ 아래의 형태로 출원시 국제출원의 일부를 구성하는 서열목록
 - ☒ 부록 C/ST.25 텍스트 파일
 - ☐ 서면 혹은 이미지 파일
- b. ☐ PCT 규칙 13의3.1(a)에 따라 국제출원과 함께 국제조사만을 목적으로 부록 C/ST.25 텍스트 파일의 형태로 제출된 서열목록
- c. ☐ 국제조사만을 목적으로 국제출원일 이후에 아래 형태로 제출된 서열목록
 - ☐ 부록 C/ST.25 텍스트 파일 (규칙 13의3.1(a))
 - ☐ 서면 혹은 이미지 파일 (규칙 제13의3.1(b) 및 시행세칙 713).

2. ☐ 추가로 서열목록에 대하여 하나 이상의 버전이나 사본이 제출된 경우, 후속 버전 또는 추가된 사본에 기재되어 있는 정보가 출원시 출원의 일부를 구성하는 정보와 동일하거나 또는 출원시의 개시범위를 벗어나지 않는다는 진술서가 제출되었습니다.

3. 추가 의견:

국 제 조 사 보 고 서
대응특허에 관한 정보

국제출원번호

PCT/KR2021/013923

국제조사보고서에서 인용된 특허문헌	공개일	대응특허문헌	공개일
US 2020-0172886 A1	2020/06/04	AU 2018-358051 A1	2020/05/14
		BR 112020008654 A2	2020/11/10
		CA 3080493 A1	2019/05/09
		CN 111886336 A	2020/11/03
		EP 3704239 A1	2020/09/09
		EP 3704239 A4	2021/08/18
		GB 2582482 A	2020/09/23
		JP 2021-503278 A	2021/02/12
		KR 10-2020-0091858 A	2020/07/31
		SG 11202003863 A	2020/05/28
		US 11180743 B2	2021/11/23
		US 2020-0087640 A1	2020/03/19
		US 2020-0299660 A1	2020/09/24
		US 2020-0370028 A1	2020/11/26
		US 2021-0017508 A1	2021/01/21
		WO 2019-089820 A1	2019/05/09
CN 111363763 A	2020/07/03	없음	
US 2020-0190494 A1	2020/06/18	AU 2019-398351 A1	2021/06/03
		CA 3117228 A1	2020/06/18
		CN 113166744 A	2021/07/23
		EP 3894550 A2	2021/10/20
		KR 10-2021-0104068 A	2021/08/24
		US 10934536 B2	2021/03/02
		US 2021-0139874 A1	2021/05/13
		US 2021-0163908 A1	2021/06/03
		WO 2020-123887 A2	2020/06/18
		WO 2020-123887 A3	2020/07/16