

(12) 특허협력조약에 의하여 공개된 국제출원

(19) 세계지식재산권기구
국제사무국

(43) 국제공개일
2025년 1월 2일 (02.01.2025)



(10) 국제공개번호
WO 2025/005777 A1

- (51) 국제특허분류:
C12N 15/10 (2006.01) C12N 15/113 (2010.01)
C12N 9/22 (2006.01) C12Q 1/6897 (2018.01)
- (21) 국제출원번호: PCT/KR2024/095888
- (22) 국제출원일: 2024년 6월 24일 (24.06.2024)
- (25) 출원언어: 한국어
- (26) 공개언어: 한국어
- (30) 우선권정보:
10-2023-0084898 2023년 6월 30일 (30.06.2023) KR
- (71) 출원인: 주식회사 엔세이지 (NSAGE CORP.) [KR/KR];
21999 인천광역시 연수구 갯벌로 112, Incheon (KR).
- (72) 발명자: 이봉희 (LEE, Bong Hee); 22009 인천광역시
연수구 컨벤시아대로252번길 50, 1403동 3305호, In-
cheon (KR). 바야르사이칸델거 (BAYARSAIKHAN,
Delger); 21990 인천광역시 연수구 송도미래로 30,
C동 2815호, Incheon (KR). 바야르사이칸고비저털
(BAYARSAIKHAN, Govigerel); 21990 인천광역시

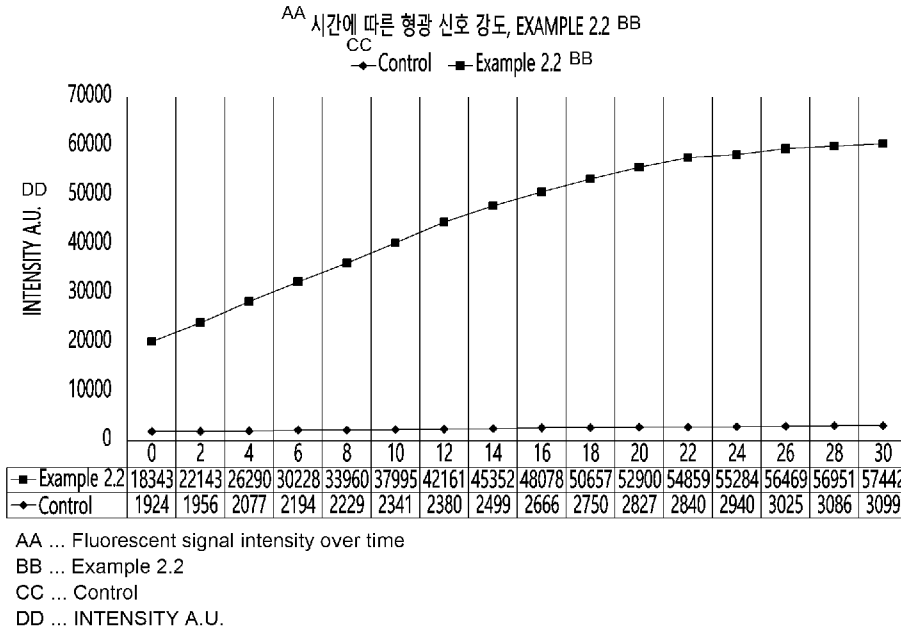
연수구 송도미래로 30, C동 2815호, Incheon (KR). 가시우나스게드리우스 (GASIUNAS, Giedrius); LT-06285 빌니우스시 엘빙고가 37-2, Vilnius (LT). 스티티리트미글 (STITILYTE, Mige); LT-08336 빌니우스시 브로니아우스 크리빅코가 10a, Vilnius (LT). 구옥재 (KOO, Okjae); 03626 서울특별시 서대문구 세무서8길 30, 109동 1203호, Seoul (KR). 강현아 (KANG, Hyun A); 21982 인천광역시 연수구 송도과학로27번길 70, 103동 802호, Incheon (KR). 이재석 (LEE, Jae Suk); 07281 서울특별시 영등포구 선유로13길 5, 201동 303호, Seoul (KR).

(74) 대리인: 특허법인아이플레이 (IPLAY PATENT LAW FIRM); 06125 서울특별시 강남구 논현로 563, 4층, Seoul (KR).

(81) 지정국 (별도의 표시가 없는 한, 가능한 모든 종류의 국내 권리의 보호를 위하여): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CV, CZ, DE, DJ, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IQ, IR, IS, IT, JM, JO, JP, KE, KG, KH, KN,

(54) Title: NOVEL CRISPR/CAS13 SYSTEM AND USE THEREOF

(54) 발명의 명칭: 신규 CRISPR/CAS13 시스템 및 그 용도



(57) Abstract: The present specification discloses a novel CRISPR/Cas13 system. The novel CRISPR/Cas13 system has both target-specific nucleic acid cleavage activity and ancillary cleavage activity. The novel/Cas13 system has both target-specific nucleic acid cleavage activity and ancillary cleavage activity. The inventors of the present specification have specified a novel CRISPR/Cas13 system from a known database, and have demonstrated the function thereof through experimentation, thereby completing the invention.

(57) 요약서: 이 명세서에서는 신규 CRISPR/Cas13 시스템을 개시한다. 위 신규 CRISPR/Cas13 시스템은 공지 데이터베이스로부터 발굴되었다. 위 신규 CRISPR/Cas13 시스템은 표적-특이적 핵산 절단 활성과 부수적 절단 활성을 모두 가진다. 이 명세서의 발명자들은 공지 데이터베이스로부터 신규 CRISPR/Cas13 시스템을 특정하고, 실험을 통해 그 기능을 실증하여 발명을 완성하였다.

[다음 쪽 계속]

KP, KR, KW, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LU, LY, MA, MD, MG, MK, MN, MU, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SA, SC, SD, SE, SG, SK, SL, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, WS, ZA, ZM, ZW.

- (84) 지정국 (별도의 표시가 없는 한, 가능한 모든 종류의 역내 권리의 보호를 위하여): ARIPO (BW, CV, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SC, 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, ME, 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))

명세서

발명의 명칭: 신규 CRISPR/CAS13 시스템 및 그 용도 기술분야

[1] 이 명세서는 Class 2 중 Type VI CRISPR/Cas 시스템에 속하는 CRISPR/Cas13 시스템에 대한 기술을 다룬다.

[2]

배경기술

[3] CRISPR/Cas13 시스템

[4] CRISPR/Cas13 시스템 개관

[5] 이 명세서에서는 신규 CRISPR/Cas13 시스템을 개시한다. 위 CRISPR/Cas13 시스템은 CRISPR/Cas 시스템의 한 종류이다. 위 CRISPR/Cas13 시스템은 이펙터 단백질 (Cas13 단백질) 및 가이드 RNA를 포함한다. 위 CRISPR/Cas13 시스템은 가이드 RNA의 스페이서 서열과 상보적인 서열, 그리고 프로토스페이서 측면 서열 (Protospacer Flanking Sequence; PFS)을 가지는 단일가닥 RNA를 인식하고, 이를 절단한다. 어떤 CRISPR/Cas13 시스템은 위 단일가닥 RNA를 절단한 후, 부수적 절단 활성이 활성화되어 주변의 단일가닥 RNA를 무작위로 절단한다.

[6] 이하 CRISPR/Cas13 시스템의 구조 및 기능에 대해 더 자세히 설명한다.

[7] CRISPR/Cas13 시스템 분류

[8] CRISPR/Cas13 시스템은 Class 2 중 Type VI CRISPR/Cas 시스템에 속한다. 상기 CRISPR/Cas13 시스템은 다시 Cas13a, Cas13b, Cas13c, Cas13d, Cas13x, Cas13y 등 몇 가지 서브타입으로 나뉜다. 위 서브타입은 각각 IV-a, IV-b, IV-c, IV-d, IV-x, 및 IV-y로 지칭되기도 한다. 각각의 서브타입에 속하는 CRISPR/Cas13 시스템은 Cas13 단백질 크기, 가이드 RNA의 구조 등에서 약간의 차이점을 보인다.

[9] CRISPR/Cas13 시스템 구성 및 기능

[10] CRISPR/Cas13 시스템은 Cas13 단백질 및 이에 대한 가이드 RNA를 포함한다. 위 Cas13 단백질 및 위 가이드 RNA는 복합체를 이루어 작용한다. 위 단백질-RNA 복합체는 표적 핵산과 결합하여 (표적 핵산을 인식하여) 그 핵산을 절단할 수 있다. 또한, 어떤 단백질-RNA 복합체는 표적 핵산을 절단한 후, 주변에 있는 임의의 핵산을 절단하는 부수적 절단 활성이 있다. 위 Cas13 단백질-가이드 RNA 복합체는 RNP (Ribonucleoprotein)으로 지칭하기도 한다. 위 Cas13 단백질은 PFS (Protospacer Flanking Sequence)를 인식하고, 핵산을 절단할 수 있다. 위 가이드 RNA는 표적 서열을 가지는 표적 핵산에 결합함으로써 위 Cas13 단백질-가이드 RNA 복합체를 표적 핵산으로 가이드할 수 있다.

[11] 위 CRISPR/Cas13 시스템은 단일가닥 RNA를 표적 핵산으로 하여 기능한다고 알려져 있다.

[12] Cas13 단백질의 구조

- [13] Cas13 단백질은 크게 REC (RECOgnition) lobe 및 NUC (NUClease) lobe로 나눌 수 있다. 위 NUC lobe는 두 개의 HEPN (Higher Eukaryotes and Prokaryotes Nucleotide-binding) 도메인을 포함한다. 위 REC lobe는 상기 Cas13 단백질이 가이드 RNA를 인식하여 복합체를 이루는 데 중요한 부분이다. 위 NUC lobe는 핵산을 절단한다. Cas13 단백질의 구조는 여러 연구자들이 이미 보고한 바 있다. 예를 들어, Xue et. al (Engineering CRISPR/Cas13 System against RNA Viruses: From Diagnostics to Therapeutics. Bioengineering (Basel), 2022 Jul; 9(7): 291)에 자세히 설명되어 있다.
- [14] 가이드 RNA의 구조
- [15] CRISPR/Cas13 시스템의 가이드 RNA는 CRISPR/Cas9 시스템의 가이드 RNA와는 달리 단일 RNA 분자로 이뤄져 있다. 이를 crRNA라 한다. 상기 가이드 RNA는 직접 반복부(direct repeat) 및 스페이서를 포함한다.
- [16] 상기 직접 반복부와 스페이서는 연결구조는 상기 CRISPR/Cas13 시스템의 서브타입에 따라 다르다. 예를 들어, Cas13a와 Cas13d 서브타입의 가이드 RNA는 5'말단에서 3'말단으로 직접 반복부 및 스페이서가 순서대로 연결되어 있다. 반면, Cas13b 서브타입의 가이드 RNA는 5'말단에서 3'말단 방향으로 스페이서 및 직접 반복부가 순서대로 연결되어 있다.
- [17] CRISPR/Cas13 시스템의 표적-특이적 핵산 절단 활성 및 PFS (Protospacer Flanking Sequence)
- [18] CRISPR/Cas13 시스템은 표적 특이적으로 핵산을 절단할 수 있다. 표적-특이적 핵산 절단 활성이 발휘되기 위해 두 가지 조건이 필요하다. 첫째로, 핵산 내에 Cas13 단백질이 인식할 수 있는 일정 길이의 염기 서열이 있어야 한다. 둘째로, 상기 일정 길이의 염기 서열 주변에 가이드 RNA에 포함된 스페이서와 상보적으로 결합할 수 있는 서열이 있어야 한다. 1) Cas13 단백질이 상기 일정 길이의 염기 서열을 인식하고, 2) 상기 스페이서가 상기 일정 길이의 염기 서열 주변 부분과 상보적으로 결합하면 위 CRISPR/Cas13 시스템은 그 핵산을 절단한다. 이때, 상기 Cas13 단백질에 의해 인식되는 일정 길이의 염기 서열을 프로토스페이서 측면 서열 (Protospacer Flanking Sequence; PFS)라 한다. 이는, CRISPR/Cas9의 프로토스페이서 인접 모티프 (Protospacer Adjacent Motif; PAM)에 대응되는 개념이다.
- [19] 상기 PFS는 상기 Cas13 단백질의 종류에 따라 정해진다. 상기 Cas13 단백질의 PFS를 안다면, 이를 사용하여 PFS 주변의 핵산을 표적화하는 CRISPR/Cas13 시스템을 설계할 수 있다.
- [20] Cas13 서브타입 중 CRISPR/Cas13d 시스템은 PFS가 필요하지 않다고 알려졌다. 위 CRISPR/Cas13d 시스템은 가이드 RNA의 스페이서가 상보적으로 결합할 수만 있으면, 다른 조건 없이 (PFS 서열 여부와는 관련없이) 해당 핵산을 절단할 수 있다.
- [21] CRISPR/Cas13 시스템의 부수적 절단 활성 (collateral cleavage activity)

- [22] 어떤 CRISPR/Cas13 시스템은 표적-특이적 핵산 절단 활성 외 부수적인 절단 기능(collateral cleavage function)을 가진다. 위 CRISPR/Cas13 시스템이 표적 핵산을 인식하면 부수적 절단 기능이 활성화된다. 부수적 절단 기능이 활성화된 CRISPR/Cas13 시스템은 주변에 있는 단일가닥 핵산을 무작위로 절단한다. 이러한 부수적 절단 기능을 응용하면, CRISPR/Cas13 시스템을 이용하여 샘플 내 표적 핵산이 있는지 검출할 수 있다.

[23]

발명의 상세한 설명

기술적 과제

- [24] 이 명세서를 통해 기존에 보고된 바 없는 신규 CRISPR/Cas13 시스템을 개시하고자 한다. 이 명세서를 통해 위 신규 CRISPR/Cas13 시스템의 각 구성 요소를 개시하고자 한다. 이 명세서를 통해 위 신규 CRISPR/Cas13 시스템의 기능을 밝히하고자 한다. 이 명세서를 통해 위 신규 CRISPR/Cas13 시스템을 어떤 용도로 활용할 수 있는지 밝히하고자 한다.

[25]

과제 해결 수단

- [26] 이 명세서의 발명자들은 공지 데이터베이스에 개시된 미생물 유전 서열 정보로부터 신규 CRISPR/Cas13 시스템의 구성요소를 특정하였다. 구체적으로, 서열번호 1의 Cas13 단백질과 서열번호 2의 직접 반복부 서열을 포함하는 가이드 RNA를 특정하였다. 위 발명자들은 특정된 정보를 토대로 신규 CRISPR/Cas13 시스템을 제조하였다. 그리고, 위 신규 CRISPR/Cas13 시스템이 표적 특이적으로 핵산을 절단할 수 있음을 실험을 통해 확인하였다. 덧붙여, 위 신규 CRISPR/Cas13 시스템은 Cas13d 서브타입에 속하며, 프로토스페이스서 측면 서열 (Protospacer Flanking Sequence; PFS) 제한 없이 동작할 수 있음을 확인하였다. 나아가, 위 신규 CRISPR/Cas13 시스템이 부수적 절단 기능을 가짐을 실험을 통해 확인하였다.
- [27] 발명자들은 위 신규 CRISPR/Cas13 시스템을 비표적 핵산 절단, 또는 표적 핵산 검출에 사용할 수 있음을 알아냈다. 위 발명자들은 비표적 핵산을 절단하는 방법, 그리고 표적 핵산을 검출하는 방법을 구체적으로 제시하였고, 이를 실증하였다.

[28]

발명의 효과

- [29] 이 명세서의 신규 CRISPR/Cas13 시스템은 단일가닥 핵산을 표적 특이적으로 절단할 수 있다. 위 신규 CRISPR/Cas13 시스템은 부수적 절단 활성을 가지므로, 표적 핵산을 인식한 후 주변의 임의의 핵산을 무작위로 절단할 수 있다. 이러한 특징을 응용하면, 위 신규 CRISPR/cas13 시스템을 표적 핵산 검출에 사용할 수 있다.

[30]

도면의 간단한 설명

- [31] 도 1은 실험예 2.1에 따라 시간에 따른 형광 신호 강도를 측정한 결과이다. 차트의 세로축은 상대적인 형광 세기, 가로축은 분으로 나타낸 반응 시간을 의미한다. Example 2.1은 표 3에 따른 Example 2.1에 대한 결과를, Control은 Cas13 단백질을 첨가한 결과를 나타낸다.
- [32] 도 2는 실험예 2.1에 따라 시간에 따른 형광 신호 강도를 측정한 결과이다. 차트의 세로축은 상대적인 형광 세기, 가로축은 분으로 나타낸 반응 시간을 의미한다. Example 2.2은 표 3에 따른 Example 2.2에 대한 결과를, Control은 Cas13 단백질을 첨가한 결과를 나타낸다.
- [33] 도 3은 실험예 2.1에 따라 시간에 따른 형광 신호 강도를 측정한 결과이다. 차트의 세로축은 상대적인 형광 세기, 가로축은 분으로 나타낸 반응 시간을 의미한다. Example 2.3은 표 3에 따른 Example 2.3에 대한 결과를, Control은 Cas13 단백질을 첨가한 결과를 나타낸다.
- [34] 도 4는 실험예 2.1에 따라 시간에 따른 형광 신호 강도를 측정한 결과이다. 차트의 세로축은 상대적인 형광 세기, 가로축은 분으로 나타낸 반응 시간을 의미한다. Example 2.4은 표 3에 따른 Example 2.4에 대한 결과를, Control은 Cas13 단백질을 첨가한 결과를 나타낸다.
- [35] 도 5는 실험예 2.1에 따라 시간에 따른 형광 신호 강도를 측정한 결과이다. 차트의 세로축은 상대적인 형광 세기, 가로축은 분으로 나타낸 반응 시간을 의미한다. Example 2.5은 표 3에 따른 Example 2.5에 대한 결과를, Control은 Cas13 단백질을 첨가한 결과를 나타낸다.
- [36] 도 6은 실험예 2.1에 따라 시간에 따른 형광 신호 강도를 측정한 결과이다. 차트의 세로축은 상대적인 형광 세기, 가로축은 분으로 나타낸 반응 시간을 의미한다. Example 2.6은 표 3에 따른 Example 2.6에 대한 결과를, Control은 Cas13 단백질을 첨가한 결과를 나타낸다.
- [37] 도 7은 실험예 2.2에 따라 농도 별 형광 신호 강도를 측정한 결과이다. 차트의 세로축은 상대적인 형광 세기, 가로축은 분으로 나타낸 반응 시간을 의미한다. Example 2.2.1 내지 Example 2.2.5는 각각 표 4에 개시된 해당 레이블의 실시예를, Control은 Cas13 단백질을 첨가한 결과를 나타낸다.
- [38] 도 8은 실험예 2.2에 따라 농도 별 형광 신호 강도를 측정한 결과이다. 차트의 세로축은 상대적인 형광 세기, 가로축은 분으로 나타낸 반응 시간을 의미한다. Example 2.5.1 내지 Example 2.5.5는 각각 표 4에 개시된 해당 레이블의 실시예를, Control은 Cas13 단백질을 첨가한 결과를 나타낸다.
- [39] 도 9는 실험예 3.1에 따라 시간에 따른 형광 신호 강도를 측정한 결과이다. 차트의 세로축은 상대적인 형광 세기, 가로축은 분으로 나타낸 반응 시간을 의미한다. Example 3.1은 표 4에 따른 Example 3.1을, Control은 Cas13 단백질을 첨가한 결과를 나타낸다.

- [40] 도 10은 실험예 3.1에 따라 시간에 따른 형광 신호 강도를 측정한 결과이다. 차트의 세로축은 상대적인 형광 세기, 가로축은 분으로 나타낸 반응 시간을 의미한다. Example 3.2은 표 4에 따른 Example 3.2을, Control은 Cas13 단백질을 첨가한 결과를 나타낸다.
- [41] 도 11은 실험예 3.1에 따라 시간에 따른 형광 신호 강도를 측정한 결과이다. 차트의 세로축은 상대적인 형광 세기, 가로축은 분으로 나타낸 반응 시간을 의미한다. Example 3.3은 표 4에 따른 Example 3.3을, Control은 Cas13 단백질을 첨가한 결과를 나타낸다.
- [42] 도 12는 실험예 3.2에 따라 농도 별 형광 신호 강도를 측정한 결과이다. 차트의 세로축은 상대적인 형광 세기, 가로축은 분으로 나타낸 반응 시간을 의미한다. Example 3.3.1 내지 Example 3.3.5는 각각 표 6에 개시된 해당 레이블의 실시예를, Control은 Cas13 단백질을 첨가한 결과를 나타낸다.
- [43] 도 13은 실험예 3.2에 따라 농도 별 형광 신호 강도를 측정한 결과이다. 차트의 세로축은 상대적인 형광 세기, 가로축은 분으로 나타낸 반응 시간을 의미한다. Example 3.4.1 내지 Example 3.4.5는 각각 표 6에 개시된 해당 레이블의 실시예를, Control은 Cas13 단백질을 첨가한 결과를 나타낸다.

[44]

발명의 실시를 위한 최선의 형태

- [45] 이하, 발명의 실시를 위한 최선의 형태를 예시적으로 개시한다. 이는 본 명세서에서 개시되는 발명의 일부 구현예를 포함하지만, 모든 구현예를 포함하고 있지는 않다. 본 단락에 서술된 실시예는 예시에 불과하며, 본 단락에 서술된 구현예만이 "본 발명의 최선의 형태"라고 이해되면 안 된다. 통상의 기술자라면 본 단락에 서술된 예시에 대한 많은 변형 및 보다 바람직한 구현예들을 떠올릴 수 있을 것이며, 그러한 내용 또한 본 발명의 실시를 위한 최선의 형태에 포함된다고 보아야 한다.
- [46] 이 명세서는 다음을 포함하는 신규 CRISPR/Cas13 조성물을 제공한다: 서열번호 1의 핵산 서열을 포함하는 Cas13 단백질, 또는 위 Cas13 단백질을 암호화하는 핵산; 그리고 프로그램 가능한 가이드 RNA, 또는 위 프로그램 가능한 가이드 RNA를 암호화하는 핵산, 위 프로그램 가능한 가이드 RNA는 5'말단에서 3'말단 방향으로 직접 반복부와 가이드 도메인이 연결된 구조를 가지고, 위 직접 반복부는 위 Cas13 단백질과 상호작용하여 복합체를 형성하고, 위 직접 반복부는 서열번호 2의 RNA 서열을 포함하고, 위 가이드 도메인은 미리 결정된 표적 핵산과 상보적으로 결합할 수 있음.
- [47] 일 실시예로, 위 Cas13 단백질을 암호화하는 핵산은 DNA 또는 mRNA이고, 위 프로그램 가능한 가이드 RNA를 암호화하는 핵산은 DNA일 수 있다.

- [48] 일 실시예로, 위 신규 CRISPR/Cas13 조성물은 위 Cas13 단백질과 위 프로그램 가능한 가이드 RNA를 포함하고, 위 Cas13 단백질과 위 프로그램 가능한 가이드 RNA는 단백질-RNA 복합체를 형성할 수 있다.
- [49] 일 실시예로, 위 신규 CRISPR/Cas13 조성물은 위 Cas13 단백질을 암호화하는 핵산과 위 프로그램 가능한 가이드 RNA를 암호화하는 핵산을 포함할 수 있다.
- [50] 일 실시예로, 위 Cas13 단백질을 암호화하는 핵산과 위 프로그램 가능한 가이드 RNA를 암호화하는 핵산은 한 분자의 벡터에 포함될 수 있다.
- [51] 일 실시예로, 위 Cas13 단백질을 암호화하는 핵산과 위 프로그램 가능한 가이드 RNA를 암호화하는 핵산은 두 분자 이상의 벡터에 각각 포함될 수 있다.
- [52] 일 실시예로, 상기 벡터는 바이러스 벡터, 비-바이러스 벡터, 또는 이들의 적절한 조합일 수 있다.
- [53] 이 명세서는 다음을 포함하는 신규 CRISPR/Cas13 시스템을 사용하여 비표적 RNA를 절단하는 방법을 제공한다: 위 신규 CRISPR/Cas13 조성물을 샘플과 혼합하는 과정, 여기서, 상기 샘플은 표적 RNA 및 비표적 RNA를 포함하고, 위 신규 CRISPR/Cas13 조성물의 프로그램 가능한 가이드 RNA의 가이드 도메인은 위 표적 RNA와 상보적으로 결합할 수 있음.
- [54] 이 명세서는 다음을 포함하는, 신규 CRISPR/Cas13 시스템을 사용하여 표적 RNA를 검출하는 방법을 제공한다: (a) 위 신규 CRISPR/Cas13 조성물, 샘플, 그리고 검출 시약을 혼합하는 과정, 여기서, 위 신규 CRISPR/Cas13 조성물의 프로그램 가능한 가이드 RNA의 가이드 도메인은 위 표적 RNA와 상보적으로 결합할 수 있고, 위 검출 시약은 리포터를 포함하고, 위 리포터는 프로브 핵산을 포함하고, 위 프로브 핵산이 절단되면 위 리포터는 검출 가능한 신호를 생성함, 여기서, 위 샘플이 위 표적 RNA를 포함하는 경우, 위 신규 CRISPR/Cas13 조성물의 단백질-RNA 복합체가 위 표적 RNA와 상보적으로 결합하고, 위 단백질-RNA 복합체의 부수적 절단 기능이 활성화되고, 이에 따라 위 프로브 핵산이 절단됨; 그리고 (b) 위 혼합물에서 위 검출 가능한 신호를 측정하는 과정, 위 검출 가능한 신호를 측정하여 위 표적 RNA에 대한 정보를 얻을 수 있음.
- [55] 일 실시예로, 위 (b) 과정은 위 검출 가능한 신호의 발생 여부; 발생하는 신호의 강도; 신호 강도의 시간에 따른 변화; 또는 위 사항의 임의의 조합을 측정하는 과정일 수 있다.
- [56] 일 실시예로, 위 표적 RNA에 대한 정보는 위 표적 RNA가 존재하는 지 여부, 위 표적 RNA가 샘플 내에 얼마나 포함되었는 지 여부, 또는 위 사항 모두일 수 있다.
- [57] 일 실시예로, 위 검출 가능한 신호는 형광 신호일 수 있다.
- [58] 이 명세서에서는 다음을 포함하는, COVID-19 진단 정보 제공 방법을 제공한다: (a) 신규 CRISPR/Cas13 복합체, 검체, 그리고 검출 시약을 혼합하는 과정, 여기서, 위 검체는 COVID-19 감염이 의심되는 환자에서 채취한 검체이고, 여기서, 위 신규 CRISPR/Cas13 복합체는 다음을 포함함: 서열번호 1의 Cas13 단백질; 그리고 가이드 RNA, 여기서, 위 가이드 RNA는 5'말단에서 3'말단 방향으로 서열번호

호 2의 직접 반복부와 가이드 도메인이 순차적으로 연결된 구조이고, 위 가이드 도메인은 서열번호 37 내지 서열번호 51, 그리고 서열번호 52 내지 서열번호 56 중 선택된 RNA 서열을 포함함, 여기서, 위 검출 시약은 리포터를 포함하고, 위 리포터는 프로브 핵산을 포함하고, 위 프로브 핵산이 절단되면 위 리포터는 형광 신호를 생성함; (b) 위 혼합물에서 형광 신호를 측정하는 과정; 그리고, (c) 위 형광 신호를 분석하여 검체를 제공한 환자가 COVID-19에 감염되었는 지에 대한 정보를 얻는 과정.

[59] 일 실시예로, 위 (b) 과정은 형광 신호 발생 여부; 발생하는 형광 신호의 강도; 형광 신호의 시간에 따른 변화; 또는 이들의 임의의 조합을 측정하는 과정임일 수 있다.

[60]

발명의 실시를 위한 형태

[61] 이하, 첨부된 도면을 참조하여, 발명의 내용을 특정한 구현예와 예시들을 통해 더욱 상세하게 설명한다. 상기 첨부된 도면은 발명의 일부 구현예를 포함하지만, 모든 구현예를 포함하고 있지는 않다는 점에 유의해야 한다. 본 명세서에 의해 개시되는 발명의 내용은 다양하게 구현될 수 있으며, 여기에 설명되는 특정 구현예로 제한되지 않는다. 이러한 구현예들은 본 명세서에 적용되는 법적 요건을 만족시키기 위해 제공되는 것으로 보아야 한다. 본 명세서에 개시된 발명이 속한 기술분야에 있어 통상의 기술자라면, 본 명세서에 개시된 발명의 내용에 대한 많은 변형 및 다른 구현예들을 떠올릴 수 있을 것이다. 따라서, 본 명세서에서 개시된 발명의 내용은 여기에 기재된 특정 구현예로 제한되지 않으며, 이에 대한 변형 및 다른 구현예들도 청구범위 내에 포함되는 것으로 이해되어야 한다.

[62]

[63] 용어의 정의

[64] 약

[65] 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, 1%, 또는 0% 정도로 변하는 양, 수준, 값, 수, 빈도, 퍼센트, 치수, 크기, 양, 중량 또는 길이를 의미한다.

[66] 아미노산 서열 표기

[67] 달리 서술하지 않는 한, 본 명세서에서 아미노산 서열을 기재할 때는 아미노산 일문자 표기법, 또는 세문자 표기법을 사용하여, N-터미널에서 C-터미널 방향으로 기재한다. 예를 들어, VSKN으로 표기하는 경우, N-터미널에서 C-터미널 방향으로 발린(Valine), 세린(Serine), 리신(Lysine), 및 아스파라긴(Asparagine)이 차례로 연결된 펩타이드를 의미한다. 또 다른 예를 들어, Thr-Leu-Lys로 표기하는 경우, N-터미널에서 C-터미널 방향으로 트레오닌(Threonine), 류신(Leucine), 및 리신(Lysine)이 차례로 연결된 펩타이드를 의미한다. 상기 일문자 표기법으로 나타

낼 수 없는 아미노산의 경우, 다른 문자를 사용하여 표기하며, 추가적으로 보충하여 설명한다.

- [68] 각각의 아미노산 표기 방법은 다음과 같다: 알라닌(Alanine; Ala, A); 아르기닌(Arginine; Arg, R); 아스파라긴(Asparagine; Asn, N); 아스파르트산(Aspartic acid; Asp, D); 시스테인(Cysteine; Cys, C); 글루탐산(Glutamic acid; Glu, E); 글루타민(Glutamine; Gln, Q); 글리신(Glycine; Gly, G); 히스티딘(Histidine; His, H); 이소류신(Isoleucine; Ile, I); 류신(Leucine; Leu, L); 리신(Lysine; Lys, K); 메티오닌(Methionine; Met, M); 페닐알라닌(Phenylalanine; Phe, F); 프롤린(Proline; Pro, P); 세린(Serine; Ser, S); 트레오닌(Threonine; Thr, T); 트립토판(Tryptophan; Trp, W); 티로신(Tyrosine; Tyr, Y); 및 발린(Valine; Val, V).

[69] 핵산 서열 표기

- [70] 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, 뉴클레오사이드 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, 뉴클레오사이드를 의미하는 경우는 각각 아데노신(A), 티미딘(T), 시티딘(C), 구아노신(G) 또는 유리딘(U)으로 해석될 수 있으며, 서열에서 뉴클레오타이드를 의미하는 경우는 상기 각각의 뉴클레오사이드를 포함하는 뉴클레오타이드를 의미하는 것으로 해석되어야 한다.

[71]

[72] 공지 데이터베이스로부터 신규 CRISPR/Cas13 시스템 발굴

- [73] 이 명세서의 발명자들은 공지 데이터베이스로부터 신규 CRISPR/Cas13 시스템을 발굴하였다. 위 발명자들은 먼저 공지된 데이터베이스의 미생물 유전 서열 정보로부터 Cas13 단백질과 가이드 RNA를 특정하였다. 그 후, 특정된 Cas13 단백질과 가이드 RNA를 합성하고, CRISPR/Cas13 복합체를 제조하였다. 위 발명자들은 제조된 CRISPR/Cas13 복합체가 표적-특이적 핵산 절단 활성화와 부수적 절단 기능이 있음을 확인하여 발명을 완성하였다.

- [74] 구체적으로, 위 발명자들은 NCBI (National Center for Biotechnology Information)에 공지된 유전자 정보를 활용하였다. NCBI에 공지된 소 위(gut)의 메타지놈(metagenome) 시퀀싱 데이터를 해독하여 소 위집에 포함된 각 미생물에 대한 유전체 정보를 얻었다. 알려진 Cas13 단백질의 서열 정보를 토대로 낙타 위에 포함된 미생물의 유전자 중 CRISPR/Cas13 시스템을 암호화하는 유전자들을 찾았다. 위 유전자로부터 Cas13 단백질의 아미노산 서열과 가이드 RNA 서열을 특정했다. 위 발명자들은 이렇게 얻어진 CRISPR/Cas13 시스템 후보군 중, 부수적 절단 기능(collateral cleavage function)이 특히 우수한 후보를 선별했다.

[75]

[76] 신규 CRISPR/Cas13 시스템

- [77] 신규 CRISPR/Cas13 시스템 개괄

- [78] 이 명세서에서는 신규 CRISPR/Cas13 시스템을 개시한다. 위 신규 CRISPR/Cas13 시스템은 공지 데이터베이스로부터 발굴되었다. 위 신규 CRISPR/Cas13 시스템은 표적 핵산을 절단할 수 있다. 위 신규 CRISPR/Cas13 시스템은 표적 핵산을 인식한 후 주변의 임의의 핵산 또한 절단할 수 있다. 달리 표현해, 위 신규 CRISPR/Cas13 시스템은 표적-특이적 핵산 절단 활성과 부수적 절단 활성을 모두 가진다. 위 신규 CRISPR/Cas13 시스템은 Cas13d 서브타입에 속한다. 위 신규 CRISPR/Cas13 시스템은 PFS 제한 없이 표적 핵산을 인식하고 절단할 수 있다. 이 명세서의 발명자들은 공지 데이터베이스로부터 신규 CRISPR/Cas13 시스템을 특정하고, 실험을 통해 그 기능을 실증하여 발명을 완성하였다.
- [79] 신규 Cas13 단백질 - 아미노산 서열
- [80] 위 신규 CRISPR/Cas13 시스템은 신규 Cas13 단백질을 포함한다. 위 신규 Cas13 단백질은 Cas13 단백질의 오소로그(ortholog)이다. 위 신규 Cas13 단백질은 공지된 데이터베이스로부터 특정된 것이나, 이전까지 그 기능이나 용도가 밝혀진 바 없다. 위 신규 Cas13 단백질은 이하 설명할 프로그램 가능한 가이드 RNA와 복합체를 이룰 수 있다. 위 신규 Cas13 단백질은 서열번호 1의 아미노산 서열을 포함하거나, 이와 유사한 아미노산 서열을 포함한다.
- [81] 신규 Cas13 단백질 - PFS 서열
- [82] 상기 Cas13 단백질은 1) 표적 핵산이 특정 서열을 포함하고, 2) 위 특정 서열과 인접한 서열이 가이드 RNA와 상보적으로 결합할 수 있는 경우, 이를 인식하여 전술한 표적-특이적 핵산 절단 기능 및/또는 부수적 절단 기능을 발휘할 수 있다. 이때, 위 특정 서열을 프로토스페이스서 측면 서열 (Protospacer Flanking Sequence; PFS)라 한다. 상기 PFS는 가이드 RNA와 상보적으로 결합할 수 있는 서열 (표적 서열)의 5'-말단 쪽, 3'-말단 쪽, 또는 양쪽 말단 모두에 인접한 서열이다.
- [83] 신규 Cas13 단백질 - PFS 서열, Cas13d 서브타입의 경우
- [84] Cas13d 서브타입에 속하는 CRISPR/Cas13 시스템은 PFS가 필요하지 않다고 알려져 있다. CRISPR/Cas13d 시스템은 표적 서열이 가이드 RNA와 상보적으로 결합할 수 있지만 하면 기능한다. 이 명세서에서 개시하는 신규 CRISPR/Cas13 시스템은 Cas13d 서브타입에 속한다는 사실이 실험을 통해 확인되었다. 따라서, 위 신규 CRISPR/Cas13 시스템은 PFS의 제한 없이 프로그램 가능한 가이드 RNA 만으로도 표적 핵산을 인식하고, 그 기능을 발휘할 수 있다.
- [85] 프로그램 가능한 가이드 RNA - 가이드 RNA 구조
- [86] 위 신규 CRISPR/Cas13 시스템은 프로그램 가능한 가이드 RNA를 포함한다. 위 프로그램 가능한 가이드 RNA는 직접 반복부 (direct repeat) 및 가이드 도메인을 포함한다. 위 프로그램 가능한 가이드 RNA는 5'-말단에서 3'-말단 방향으로, 상기 직접 반복부 및 가이드 도메인이 순차적으로 연결되어 있다. 달리 표현하여, 상기 프로그램 가능한 가이드 RNA는 다음 구조를 포함한다:
- [87] 5' - (직접 반복부) - (가이드 도메인) - 3'

- [88] 여기서, 필요에 따라 직접 반복부와 가이드 도메인 사이에 추가 도메인이 더 포함될 수 있다.
- [89] 각각의 도메인에 대해서는 이하 더 구체적으로 설명한다.
- [90] 프로그램 가능한 가이드 RNA - 직접 반복부
- [91] 위 직접 반복부는 스템-루프 구조를 형성하는 부분이다. 위 직접 반복부는 위 프로그램 가능한 가이드 RNA가 위 신규 Cas13 단백질과 상호작용하여 복합체를 이루도록 한다. 위 직접 반복부의 핵산 서열은 위 Cas13 단백질에 따라 달라질 수 있다.
- [92] 프로그램 가능한 가이드 RNA - 가이드 도메인
- [93] 위 가이드 도메인은 《CRISPR/Cas13 시스템》에서 설명한 가이드 RNA의 스페이서에 대응된다. 위 가이드 도메인은 미리 결정된 표적 서열에 따라 인위적으로 설계된다. 위 가이드 도메인을 어떻게 설계하느냐에 따라, 위 CRISPR/Cas13 시스템이 어떤 핵산을 표적으로 기능할 지 결정된다.
- [94] 신규 CRISPR/Cas13 시스템의 기능 - 표적 RNA 절단 활성화
- [95] 위 신규 CRISPR/Cas13 시스템은 표적 RNA를 절단할 수 있다. 위 신규 CRISPR/Cas13 복합체가 표적 RNA와 결합하면 이를 절단할 수 있다. 위 표적 RNA에 따라 위 신규 CRISPR/Cas13 시스템의 프로그램 가능한 가이드 RNA를 설계한다. 위 프로그램 가능한 가이드 RNA는 위 표적 RNA와 상보적으로 결합할 수 있도록 설계되었다.
- [96] 신규 CRISPR/Cas13 시스템의 기능 - 부수적 절단 활성화
- [97] 위 신규 CRISPR/Cas13 시스템은 부수적 절단 활성을 가진다. 위 신규 CRISPR/Cas13 시스템이 표적 RNA와 결합하면 부수적 절단 기능이 활성화된다. 부수적 절단 기능이 활성화된 신규 CRISPR/Cas13 시스템은 주변의 단일가닥 RNA를 무작위로 절단한다. 여기서, 상기 부수적 절단 활성화에 의해 절단되는 단일가닥 RNA의 핵산 서열은 상기 표적 RNA의 서열과는 관련없다. 어떤 핵산 서열을 가지는 부수적 절단 기능이 활성화된 신계 CRISPR/Cas13 시스템에 의해 절단된다.
- [98] 신규 CRISPR/Cas13 복합체
- [99] 위 신규 CRISPR/Cas13 시스템은 상기 Cas13 단백질 및 위 프로그램 가능한 가이드 RNA의 복합체를 지칭할 수 있다. 위 복합체는 단백질-RNA 복합체 또는 리보뉴클레오프로틴 (RNP; RiboNucleoProtein)으로 지칭될 수 있다.
- [100] 신규 CRISPR/Cas13 시스템의 각 구성요소 발현 벡터
- [101] 위 신규 CRISPR/Cas13 시스템은 위 Cas13 단백질과 위 프로그램 가능한 가이드 RNA를 발현할 수 있는 벡터를 지칭할 수 있다. 위 발현 벡터는 위 신규 CRISPR/Cas13 시스템의 각 구성요소를 발현할 수 있다면 그 구성이나 형태가 제한되지 않는다. 위 발현 벡터는 위 Cas13 단백질을 암호화하는 핵산과 위 프로그램 가능한 가이드 RNA를 암호화하는 핵산을 포함하고, 프로모터 등 기타 구성을 포함할 수 있다. 위 발현 벡터는 DNA, mRNA, 또는 이들의 적절한 조합일 수 있다.
- [102] 신규 CRISPR/Cas13 조성물

[103] 위 신규 CRISPR/Cas13 시스템은 신규 CRISPR/Cas13 조성물을 지칭할 수 있다.

[104] 위 신규 CRISPR/Cas13 조성물은 다음을 포함한다: 위 신규 Cas13 단백질 또는 위 Cas13 단백질을 암호화하는 핵산; 그리고 위 프로그램 가능한 가이드 RNA 또는 위 프로그램 가능한 가이드 RNA를 암호화하는 핵산.

[105]

[106] 신규 CRISPR/Cas13 시스템의 용도

[107] 위 신규 CRISPR/Cas13 시스템은 프로그램 가능한 가이드 RNA의 설계에 따라 미리 결정된 표적 RNA와 결합할 수 있다 (표적 RNA 인식 기능). 위 신규 CRISPR/Cas13 시스템은 위 미리 결정된 표적 RNA를 절단할 수 있다 (표적-특이적 핵산 절단 활성). 위 신규 CRISPR/Cas13 시스템은 위 미리 결정된 표적 RNA를 절단한 후, 주변의 단일가닥 RNA를 서열 관계없이 무작위로 절단할 수 있다 (부수적 절단 활성). 이러한 성질을 활용하면, 위 CRISPR/Cas13 시스템을 임의의 핵산 서열을 가지는 비표적 RNA를 절단하는 데 활용할 수 있다. 또한, 위 CRISPR/Cas13 시스템을 샘플 내 표적 RNA가 있는 지 검출하는 데 활용할 수 있다. 위 용도에 대해서는 이하 더 자세히 설명한다.

[108]

[109] 신규 CRISPR/Cas13 시스템을 이용한 비표적 핵산 절단 방법

[110] 비표적 핵산 절단 방법 개관

[111] 이 명세서에서는 신규 CRISPR/Cas13 시스템을 사용한 비표적 핵산 절단 방법을 개시한다. 위 비표적 핵산 절단 방법은 신규 CRISPR/Cas13 시스템이 표적 핵산을 인식하면 부수적 절단 기능이 활성화되어 임의의 핵산을 자르는 성질을 활용한다. 위 비표적 핵산 절단 방법은 신규 CRISPR/Cas13 시스템에 표적 핵산과 비표적 핵산을 접촉시키는 과정을 포함한다. 위 신규 CRISPR/Cas13 시스템은 《신규 CRISPR/Cas13 시스템》 단락에서 설명하였다. 위 CRISPR/Cas13 시스템의 가이드 RNA의 가이드 도메인은 위 표적 핵산을 표적할 수 있도록 설계되었다.

[112] 이하, 위 방법에 대해 더 상세히 설명한다.

[113] 신규 CRISPR/Cas13 시스템

[114] 위 비표적 핵산을 절단하기 위해, 본 명세서에서 제공하는 신규 CRISPR/Cas13 시스템을 사용한다. 위 신규 CRISPR/Cas13 시스템은 《신규 CRISPR/Cas13 시스템》에서 설명된 바와 같다. 목적에 따라 CRISPR/Cas13 시스템이 사용되는 형태는 달라질 수 있다. 예를 들면, 신규 CRISPR/Cas13 복합체; 신규 CRISPR/Cas13 시스템의 각 구성요소 발현 벡터; 신규 CRISPR/Cas13 조성물; 또는 이들의 적절한 조합이 사용될 수 있다.

[115] 표적 핵산

[116] 위 비표적 핵산 절단 방법에서 표적 핵산은 위 신규 CRISPR/Cas13 시스템이 인식할 수 있는 핵산을 의미한다. 구체적으로, 위 표적 핵산은 위 신규 CRISPR/Cas13 시스템의 프로그래밍 가능한 가이드 RNA의 가이드 도메인과 혼성화

(hybridized) 될 수 있다. 달리 표현하여, 위 표적 핵산은 위 가이드 도메인과 상보적인 핵산 서열을 포함한다.

[117] 비표적 핵산

[118] 위 비표적 핵산은 위 신규 CRISPR/Cas13 시스템의 Cas13 단백질이 절단할 수 있는 단일가닥 핵산이다. 위 표적 핵산과 달리, 위 비표적 핵산은 그 서열 및 길이에 제한이 없다.

[119] 표적 핵산 및 비표적 핵산을 접촉시키는 순서

[120] 위 비표적 핵산 절단 방법은 위 신규 CRISPR/Cas13 시스템의 부수적 절단 기능을 이용한다. 위 부수적 절단 기능은 위 신규 CRISPR/Cas13 시스템이 표적 핵산을 인식했을 때 활성화된다. 따라서, 위 비표적 핵산 절단 방법은 위 신규 CRISPR/Cas13 시스템이 표적 핵산과 먼저 접촉하고, 그 후 비표적 핵산과 접촉하는 순서로 수행되는 것이 바람직하다. 하지만, 비표적 핵산이 먼저 접촉하더라도, 신규 CRISPR/Cas13 시스템과 충분히 인접해 있는 한, 표적 핵산이 나중에 접촉해도 비표적 핵산이 절단될 수 있다. 결론적으로, 위 비표적 핵산 절단 방법을 수행할 때, 신규 CRISPR/Cas13 시스템을 표적 핵산과 비표적 핵산에 접촉시키는 순서는 크게 중요하지 않다. 위 비표적 핵산 절단 방법을 수행할 때, 신규 CRISPR/Cas13 시스템을 표적 핵산과 비표적 핵산에 접촉시키는 순서는 필요에 따라 다양하게 할 수 있다. 경우에 따라, 위 표적 핵산과 비표적 핵산을 신규 CRISPR/Cas13 시스템에 동시에 접촉시킬 수 있다.

[121]

[122] 신규 CRISPR/Cas13 시스템을 이용한 표적 핵산 검출 방법

[123] 표적 핵산 검출 방법 개관

[124] 이 명세서는 신규 CRISPR/Cas13 시스템을 활용한 표적 핵산 검출 방법을 개시한다. 위 표적 핵산 검출 방법은 위 신규 CRISPR/Cas13 시스템의 부수적 절단 활성을 이용한다. 위 표적 핵산 검출 방법은 위 신규 CRISPR/Cas13 시스템을 샘플 및 검출시약과 혼합하는 과정; 그리고, 위 혼합물에서 미리 정해 놓은 신호가 생성되는 지 측정하는 과정을 포함한다. 여기서, 위 샘플은 표적 핵산을 포함할 가능성이 있는 시료이다. 위 검출 시약은 특정 조건에서 특정 신호를 생성하는 리포터를 포함한다. 위 리포터는 프로브 핵산을 포함한다. 위 프로브 핵산이 절단되면 위 리포터는 검출 가능한 신호 (예를 들면, 형광)를 생성한다. 샘플에 표적 핵산이 있다면 위 신규 CRISPR/Cas13 시스템은 위 표적 핵산을 인식한다. 위 신규 CRISPR/Cas13 시스템이 위 표적 핵산을 인식하면, 부수적 절단 기능이 활성화되어 주변의 핵산을 무작위로 절단한다. 이로 인해 리포터의 프로브 핵산이 절단되면 검출 가능한 신호가 생성된다. 위 검출 가능한 신호를 측정하고 분석하면, 샘플에 위 표적 핵산이 있는지, 얼마나 많이 있는지 알 수 있다.

[125] 이하 이 방법에 사용되는 각 구성요소 및 각각의 과정에 대해 상세히 설명한다.

[126] 샘플

- [127] 위 신규 CRISPR/Cas13 시스템을 이용한 표적 핵산 검출 방법은 샘플을 가지고 수행된다. 위 방법을 수행하면 위 샘플이 표적 핵산을 포함하는 지, 표적 핵산을 얼마나 포함하는 지 등을 알 수 있다. 달리 말해, 위 샘플은 표적 핵산 검출 대상이다. 위 샘플은 필요에 따라 다양한 형태일 수 있다. 예를 들면, 위 샘플은 인간 또는 인간이 아닌 동물의 체액을 포함할 수 있다. 또 다른 예를 들면, 위 샘플은 인간 또는 인간이 아닌 동물의 체액을 적절히 전처리한 시료일 수 있다.
- [128] 신규 CRISPR/Cas13 시스템
- [129] 위 샘플이 표적 핵산을 포함하는 지, 표적 핵산을 얼마나 포함하는 지 등을 알기 위해 신규 CRISPR/Cas13 시스템을 사용한다. 위 신규 CRISPR/Cas13 시스템은 《신규 CRISPR/Cas13 시스템》에서 설명된 바와 같다. 위 신규 CRISPR/Cas13 시스템은 신규 CRISPR/Cas13 복합체, 신규 CRISPR/Cas13 시스템의 각 구성요소 발현 벡터, 신규 CRISPR/Cas13 조성물, 또는 이의 적절한 조합 형태로 사용될 수 있다.
- [130] 검출 시약
- [131] 위 샘플이 표적 핵산을 포함할 때, 측정 가능한 신호를 만들기 위해 검출 시약을 사용한다. 위 검출 시약은 리포터를 포함한다. 위 리포터는 프로브 핵산을 포함한다. 위 리포터는 프로브 핵산이 절단되면 측정 가능한 신호를 내보낸다. 측정 가능한 신호는, 예를 들어 형광 신호일 수 있다. 위 샘플에 표적 핵산이 있는 경우, 위 신규 CRISPR/Cas13 시스템은 위 표적 핵산과 결합할 수 있다. 위 신규 CRISPR/Cas13 시스템이 위 표적 핵산과 결합하면, 부수적 절단 기능이 활성화된다. 부수적 절단 기능이 활성화되면 위 신규 CRISPR/Cas13 시스템 주변의 핵산이 무작위로 절단된다. 이로 인해 위 리포터의 프로브 핵산이 절단되면, 위 리포터는 측정 가능한 신호를 생성한다. 결론적으로, 샘플, 신규 CRISPR/Cas13 시스템, 그리고 검출 시약을 혼합했을 때, 위 샘플에 표적 핵산이 있다면 리포터에 의해 측정 가능한 신호가 발생할 것이다.
- [132] 위 검출 시약은 추가 물질을 더 포함할 수 있다. 위 추가 물질은 필요에 따라 다양하게 선택된다. 예를 들어, 위 추가 물질은 신규 CRISPR/Cas13 시스템의 부수적 절단 활성을 촉진하는 물질일 수 있다. 또 다른 예로, 위 추가 물질은 위 리포터에서 발생한 측정 가능한 신호를 증폭하는 물질일 수 있다.
- [133] 측정 가능한 신호
- [134] 위 측정 가능한 신호는 표적 핵산 검출 방법을 수행할 때 측정할 수 있는 신호이다. 이는 위 검출 시약에 포함된 리포터의 종류에 따라 결정된다. 위 방법의 목적을 이룰 수 있는 한, 위 측정 가능한 신호가 무엇인지는 중요하지 않다. 위 리포터로부터 생성되는 신호는 다양할 수 있다. 예를 들어, 위 신호는 특정 파장의 형광일 수 있다. 위 측정 가능한 신호가 발생하는 지, 발생하는 신호는 얼마나 강한지, 그리고 신호 강도가 어떻게 변하는지 등을 측정하면 위 표적 핵산에 대한 정보를 얻을 수 있다. 위 표적 핵산에 대한 정보는, 예를 들어 샘플 내 표적 핵산이 있는 지, 양은 얼마나 되는지 등일 수 있다.

[135] 샘플, CRISPR/Cas13 시스템, 검출 시약을 혼합하는 과정

[136] 위에서 설명한 바, 표적 핵산, 신규 CRISPR/Cas13 시스템, 그리고 리포터가 접촉하면 측정 가능한 신호가 발생한다. 따라서, 표적 핵산을 검출하기 위해서는 샘플, 신규 CRISPR/Cas13 시스템, 그리고 검출 시약을 모두 한 곳에 모아야 한다. 위 과정은 다양하게 표현될 수 있다. 예를 들어, 위 샘플, 위 신규 CRISPR/Cas13 시스템, 그리고 위 검출 시약을 섞거나, 혼합하거나, 반응시키거나, 접촉시키거나, 또는 위 행위를 적절히 조합하여 한 곳에 모을 수 있다. 위 과정은 위 신규 CRISPR/Cas13 시스템이 위 표적 핵산을 인식하고, 부수적 절단 기능이 활성화되어 위 리포터의 프로브 핵산을 절단하고, 리포터로부터 측정 가능한 신호가 발생하고, 이를 측정하는 일련의 과정이 방해 받지 않는 조건에서 수행되어야 한다. 위 조건을 만족하는 한, 위 과정은 그 방법이나 환경, 그리고 수행 장소가 제한되지 않는다. 편하게 설명하게 위해, 이후 이 과정을 "혼합한다"고 표현하겠다.

[137] 샘플, CRISPR/Cas13 시스템, 검출 시약을 혼합하는 순서

[138] 위 표적 핵산 검출 방법에서 샘플, 신규 CRISPR/Cas13 시스템, 그리고 검출 시약을 혼합하는 순서는 크게 중요하지 않다. 위 샘플, 위 신규 CRISPR/Cas13 시스템, 그리고 위 검출 시약을 동시에 혼합할 수 있고, 임의의 순서로 혼합할 수 있다. 위 표적 핵산 검출 방법의 원리 상 위 샘플과 위 신규 CRISPR/Cas13 시스템을 먼저 혼합하고, 그 후 검출 시약을 혼합하는 순서가 바람직하게 여겨질 수 있다. 하지만, 적절한 시간 내에 혼합하기만 하면 위에서 설명한 일련의 반응이 충분히 일어날 수 있다. 위 샘플, 위 신규 CRISPR/Cas13 시스템, 그리고 위 검출 시약을 혼합하는 순서는 표적 핵산 검출 방법의 효과에 큰 영향이 없다.

[139] 검출 가능한 신호를 측정하는 과정

[140] 위 표적 핵산 검출 방법은 위 검출 가능한 신호를 측정하는 과정을 포함한다. 위에서 설명한 대로, 샘플 내 표적 핵산이 있는 경우, 일련의 반응을 거쳐 검출 시약의 리포터가 검출 가능한 신호를 발산한다. 발산되는 신호가 무엇인 지, 어떤 패턴으로 방출되는 지 등을 고려하여 위 검출 가능한 신호를 측정하는 방법을 결정한다. 위 방법은 특별히 제한되지 않으며, 공지된 방법을 사용할 수 있다.

[141]

[142] 발명의 가능한 실시예

[143] Cas13 단백질

[144] 실시예 1, 신규 Cas13d 단백질

[145] VI-D 서브타입의 Cas13 단백질 (Cas13d 단백질이라고도 지칭함).

[146] 실시예 2, 신규 Cas13 단백질

[147] 실시예 1에 있어서, 상기 Cas13 단백질은

VSKNDNIKSKAKALGLKSTFQVGDEVVMTSFGKG

NKAIVEKIVRGTDVQSVPTPEPNFSAE

IEGKKFDLVGRAHIQTKSDNPQYSKKRTGDDMIGAKAALEKRFFGGTFDDNIH

IQLAYNV LDIEKILSVHINNIVYTLNNIRRKDNAEDDDF

IGYMSTRNDYDTFIEPRKHNISEDAKS
 IDKSRSFEEYLQPPVKDCLHYFGNTFFAPREIEKTYTDNRGFERKKKVTV
 NSLIDEKEI YYIFALLGGLRQFCTHDNKSGRNWLYSLEE
 NGINSDAKAVLDKYYNsAVARIDESFVDNA
 SKTNFKLIFNAMDVSDEALQDNIAKAFYKFTVCKSFKNMGFSIKKLREQ
 LLELPEYEGLK DKHYDSVRSKLYQIMDFVIYLSFKDEKF
 KKDNEEKINNIVNELRATLNEEDKGRVYASYA
 ERMKSELKPAIARLKSDIDKIKDSRVKEFELDASVKYRLSKVVESVR
 LKDRATYFTKLIY LTTFLDGKEINDLLTTLIHQFENIA
 SFIDVMNDRGIDCRFSDGYKLFESSKQIAFELRN
 VNSFARMTRTSKDDENATHMMYIDAAEILGTDYTEEQIEEHLNLE
 KKRMIPTGKKADMNF RNFIINNVIKSSRFNYLVRYSNPK
 KIRALADNEGVIKRVLGELPDAQIDRYTLLCGFNP
 ADRQEKTDKLAKAITGLRFNDFENVKQGANTEGESQESIDKAQ
 KQGLISLYLTVLYLLTK NLVYVNSRYFLAFHCLERDAQL
 LGSGAGHHEPYVALTQRFINEDKLNEHACEYLKTNIAN
 SDEYTIRIFRNNAAHLSAVRNANLYIDKLKEFKSYYEIYHF
 LSQENIYGKYCVDKKYVTA DENGSKTISVKISKDYCPQV
 YIDKSLEYFDKLNKYGTICKDFTKALNSPFGYNLARYKNL
 SIEGLFDRNRPGDKGENTFED(서열번호 1)의 아미노산 서열을 포함함.

[148] 실시예 3, 유사한 서열 포함

[149] 실시예 1에 있어서, 상기 Cas13 단백질은 서열번호 1의 아미노산 서열과 약 50% 이상, 약 51% 이상, 약 52% 이상, 약 53% 이상, 약 54% 이상, 약 55% 이상, 약 56% 이상, 약 57% 이상, 약 58% 이상, 약 59% 이상, 약 60% 이상, 약 61% 이상, 약 62% 이상, 약 63% 이상, 약 64% 이상, 약 65% 이상, 약 66% 이상, 약 67% 이상, 약 68% 이상, 약 69% 이상, 약 70% 이상, 약 71% 이상, 약 72% 이상, 약 73% 이상, 약 74% 이상, 약 75% 이상, 약 76% 이상, 약 77% 이상, 약 78% 이상, 약 79% 이상, 약 80% 이상, 약 81% 이상, 약 82% 이상, 약 83% 이상, 약 84% 이상, 약 85% 이상, 약 86% 이상, 약 87% 이상, 약 88% 이상, 약 89% 이상, 약 90% 이상, 약 91% 이상, 약 92% 이상, 약 93% 이상, 약 94% 이상, 약 95% 이상, 약 96% 이상, 약 97% 이상, 약 98% 이상, 약 99% 이상, 또는 약 100% 일치하거나(identical), 동일하거나(same), 매칭되거나(matched), 및/또는 동등한(equivalent) 아미노산 서열을 가짐.

[150] 실시예 4, 기능 한정

[151] 실시예 1 내지 실시예 3 중 어느 하나에 있어서, 상기 Cas13 단백질은 단일가닥 핵산을 절단하는 기능을 가짐.

[152] 실시예 5, PFS 한정

[153] 실시예 1 내지 실시예 4 중 어느 하나에 있어서, 상기 Cas13 단백질은 다음 중 선택된 프로토스페이서 측면 서열 (Protospacer Flanking Sequence; PFS)를 인식함:

- [154] 5'-N-3', 5'-NN-3', 및 5'-NNN-3' 중 선택된 RNA 서열,
 [155] 여기서, N은 각각 독립적으로 A, U, C, 또는 G 중 선택된 것임; 및
 [156] 5'-N-3', 5'-NN-3', 및 5'-NNN-3' 중 선택된 DNA 서열,
 [157] 여기서, N은 각각 독립적으로 A, T, C, 또는 G 중 선택된 것임.
 [158] 실시예 6, PFS 필요없음
 [159] 실시예 1 내지 실시예 3 내지 실시예 4 중 어느 하나에 있어서, 상기 Cas13 단백
 질은 단일가닥 핵산을 절단하는 기능을 발휘할 때,
 [160] PFS를 인식하지 않음, PFS를 인식할 필요가 없음, 및/또는 PFS에 의존하지 않
 음.
 [161] 실시예 7, 변형된 도메인 포함
 [162] 실시예 1 내지 실시예 6 중 어느 하나에 있어서, 상기 Cas13 단백질은 변형된 단
 백질 도메인을 포함함.
 [163] 실시예 8, 변형의 의미
 [164] 실시예 7에 있어서, 상기 Cas13 단백질 중 변형된 단백질 도메인은 변형되지 않
 은 단백질 도메인과 비교하여 하나 이상의 아미노산이 치환되거나, 삭제되거나,
 및/또는 삽입된 것을 의미함.
 [165] 실시예 9, 변형된 도메인
 [166] 실시예 7 또는 실시예 8에 있어서, 상기 Cas13 단백질은 변형된 HEPN 도메인을
 포함함.
 [167] 실시예 10, 추가적인 도메인 포함
 [168] 실시예 1 내지 실시예 9 중 어느 하나에 있어서, 상기 Cas13 단백질은 추가적인
 단백질 도메인을 더 포함함.
 [169] 실시예 11, 핵산 한정
 [170] 실시예 1 내지 실시예 10 중 어느 하나에 있어서, 상기 단일가닥 핵산은 단일가
 닥 RNA 또는 단일가닥 DNA임.
 [171]
 [172] 프로그램 가능한 가이드 RNA
 [173] 실시예 12, 프로그램 가능한 가이드 RNA
 [174] 다음을 포함하는 프로그램 가능한 가이드 RNA:
 [175] 직접 반복부(direct repeat); 및
 [176] 미리 결정된 표적 서열을 표적할 수 있도록 설계된 가이드 도메인,
 [177] 여기서, 상기 프로그램 가능한 가이드 RNA는 5'말단에서 3'말단 방향으로 상기
 직접 반복부 및 상기 가이드 도메인이 순차적으로 연결된 것이고,
 [178] 상기 직접 반복부는 VI-D 서브타입의 Cas13 단백질과 상호작용하여 복합체를
 형성할 수 있는 것임.
 [179] 실시예 13, 구조식 표현
 [180] 실시예 12에 있어서, 상기 프로그램 가능한 가이드 RNA는 다음을 포함함:
 [181] 5'-[직접 반복부]-[가이드 도메인]-3',

- [182] 여기서, 상기 직접 반복부와 상기 가이드 도메인은 실시예 12에서 정의된 바와 같음.
- [183] 실시예 14, 직접 반복부 서열 한정
- [184] 실시예 12 내지 실시예 13 중 어느 하나에 있어서, 상기 직접 반복부는 GAAACGUACUACACCCUUUUUGUAAGGGUCUGAAACC(서열번호 2)의 RNA 서열을 가짐.
- [185] 실시예 15, 직접 반복부와 유사한 서열 포함
- [186] 실시예 12에 있어서, 상기 직접 반복부는 GAAACGUACUACACCCUUUUUGUAAGGGUCUGAAACC(서열번호 2)의 RNA 서열과 약 50% 이상, 약 51% 이상, 약 52% 이상, 약 53% 이상, 약 54% 이상, 약 55% 이상, 약 56% 이상, 약 57% 이상, 약 58% 이상, 약 59% 이상, 약 60% 이상, 약 61% 이상, 약 62% 이상, 약 63% 이상, 약 64% 이상, 약 65% 이상, 약 66% 이상, 약 67% 이상, 약 68% 이상, 약 69% 이상, 약 70% 이상, 약 71% 이상, 약 72% 이상, 약 73% 이상, 약 74% 이상, 약 75% 이상, 약 76% 이상, 약 77% 이상, 약 78% 이상, 약 79% 이상, 약 80% 이상, 약 81% 이상, 약 82% 이상, 약 83% 이상, 약 84% 이상, 약 85% 이상, 약 86% 이상, 약 87% 이상, 약 88% 이상, 약 89% 이상, 약 90% 이상, 약 91% 이상, 약 92% 이상, 약 93% 이상, 약 94% 이상, 약 95% 이상, 약 96% 이상, 약 97% 이상, 약 98% 이상, 약 99% 이상, 또는 약 100% 일치하거나(identical), 동일하거나(same), 매칭되거나(matched), 및/또는 동등한(equivalent) RNA 서열을 가짐.
- [187] 실시예 16, 직접 반복부 기능 한정
- [188] 실시예 12 내지 실시예 15 중 어느 하나에 있어서, 상기 직접 반복부는 실시예 1 내지 실시예 11 중 어느 하나의 Cas13 단백질과 상호작용하여 복합체를 이룰 수 있는 것임.
- [189] 실시예 17, 길이 한정
- [190] 실시예 12 내지 실시예 16 중 어느 하나에 있어서, 상기 가이드 도메인은 10nt, 11nt, 12nt, 13nt, 14nt, 15nt, 16nt, 17nt, 18nt, 19nt, 20nt, 21nt, 22nt, 23nt, 24nt, 25nt, 26nt, 27nt, 28nt, 29nt, 30nt, 31nt, 32nt, 33nt, 34nt, 35nt, 36nt, 37nt, 38nt, 39nt, 40nt, 41nt, 42nt, 43nt, 44nt, 45nt, 46nt, 47nt, 48nt, 49nt, 및 50nt 중 선택된 길이를 가지거나, 상기 수치범위 중 선택된 두 수치 범위 내 길이를 가짐 (예를 들어, 17nt 내지 20nt).
- [191] 실시예 18, 표적 의미
- [192] 실시예 12 내지 실시예 17 중 어느 하나에 있어서, 상기 가이드 도메인은 상기 미리 결정된 표적 서열의 핵산과 상보적으로 결합하거나 (complementary bind), 및/또는 혼성화될 수 있는 것 (hybridize)임.
- [193] 실시예 19, 상보적인 서열, % 한정
- [194] 실시예 12 내지 실시예 18 중 어느 하나에 있어서, 상기 가이드 도메인은 상기 미리 결정된 표적 서열과 약 50% 이상, 약 51% 이상, 약 52% 이상, 약 53% 이상, 약 54% 이상, 약 55% 이상, 약 56% 이상, 약 57% 이상, 약 58% 이상, 약 59% 이상,

약 60% 이상, 약 61% 이상, 약 62% 이상, 약 63% 이상, 약 64% 이상, 약 65% 이상, 약 66% 이상, 약 67% 이상, 약 68% 이상, 약 69% 이상, 약 70% 이상, 약 71% 이상, 약 72% 이상, 약 73% 이상, 약 74% 이상, 약 75% 이상, 약 76% 이상, 약 77% 이상, 약 78% 이상, 약 79% 이상, 약 80% 이상, 약 81% 이상, 약 82% 이상, 약 83% 이상, 약 84% 이상, 약 85% 이상, 약 86% 이상, 약 87% 이상, 약 88% 이상, 약 89% 이상, 약 90% 이상, 약 91% 이상, 약 92% 이상, 약 93% 이상, 약 94% 이상, 약 95% 이상, 약 96% 이상, 약 97% 이상, 약 98% 이상, 약 99% 이상, 또는 약 100% 상보적인 서열을 가짐.

[195] 실시예 20, 상보적인 서열, 미스매치 개수 한정

[196] 실시예 12 내지 실시예 19 중 어느 하나에 있어서, 상기 가이드 도메인은 상기 미리 결정된 표적 서열과 상보적인 서열이 되, 0개, 1개, 2개, 3개, 4개, 5개, 6개, 7개, 8개, 9개, 10개, 11개, 12개, 13개, 14개, 또는 15개의 미스매치를 포함함.

[197] 실시예 21, 표적 RNA 한정

[198] 실시예 12 내지 실시예 20 중 어느 하나에 있어서, 상기 미리 결정된 표적 서열의 핵산은 RNA 또는 DNA임.

[199]

[200] **Cas13 복합체**

[201] 실시예 22, Cas13 복합체

[202] 다음을 포함하는 CRISPR/Cas13 복합체:

[203] 실시예 1 내지 실시예 11 중 어느 하나의 Cas13 단백질; 및

[204] 실시예 12 내지 실시예 21 중 어느 하나의 프로그램 가능한 가이드 RNA,

[205] 여기서, 상기 Cas13 단백질 및 상기 프로그램 가능한 가이드 RNA의 직접 반복부가 상호작용하여 복합체를 형성함.

[206] 실시예 23, PFS 및 표적 핵산 인식

[207] 실시예 22에 있어서, 상기 CRISPR/Cas13 복합체는 표적 핵산과 결합할 수 있으며, 상기 표적 핵산의 서열은 다음 서열을 포함함:

[208] 미리 결정된 표적 서열로, 상기 미리 결정된 표적 서열은 상기 프로그램 가능한 가이드 RNA의 가이드 도메인의 서열과 약 50% 이상, 약 51% 이상, 약 52% 이상, 약 53% 이상, 약 54% 이상, 약 55% 이상, 약 56% 이상, 약 57% 이상, 약 58% 이상, 약 59% 이상, 약 60% 이상, 약 61% 이상, 약 62% 이상, 약 63% 이상, 약 64% 이상, 약 65% 이상, 약 66% 이상, 약 67% 이상, 약 68% 이상, 약 69% 이상, 약 70% 이상, 약 71% 이상, 약 72% 이상, 약 73% 이상, 약 74% 이상, 약 75% 이상, 약 76% 이상, 약 77% 이상, 약 78% 이상, 약 79% 이상, 약 80% 이상, 약 81% 이상, 약 82% 이상, 약 83% 이상, 약 84% 이상, 약 85% 이상, 약 86% 이상, 약 87% 이상, 약 88% 이상, 약 89% 이상, 약 90% 이상, 약 91% 이상, 약 92% 이상, 약 93% 이상, 약 94% 이상, 약 95% 이상, 약 96% 이상, 약 97% 이상, 약 98% 이상, 약 99% 이상, 또는 약 100% 상보적인 서열임.

[209] 실시예 24, PFS 추가 포함

- [210] 실시예 23에 있어서, 상기 CRISPR/Cas13 복합체의 상기 Cas13 단백질이 PFS를 인식하는 것일 경우, 상기 표적 핵산의 서열은 상기 Cas13 단백질이 인식하는 Protospacer Flanking Sequence (PFS)를 더 포함함.
- [211] 실시예 25, PFS 한정
- [212] 실시예 24에 있어서, 상기 PFS는 다음 중 선택된 것임:
- [213] 5'-N-3', 5'-NN-3', 및 5'-NNN-3' 중 선택된 RNA 서열,
- [214] 여기서, N은 각각 독립적으로 A, U, C, 또는 G 중 선택된 것임; 및
- [215] 5'-N-3', 5'-NN-3', 및 5'-NNN-3' 중 선택된 DNA 서열,
- [216] 여기서, N은 각각 독립적으로 A, T, C, 또는 G 중 선택된 것임.
- [217] 실시예 26, PFS 및 표적 서열 위치 관계
- [218] 실시예 23 내지 실시예 25 중 어느 하나에 있어서, 상기 표적 핵산 내 상기 PFS는 상기 표적 서열의 3'-말단 또는 5'-말단에 인접함.
- [219] 실시예 27, PFS 및 표적 서열의 거리
- [220] 실시예 26에 있어서, 상기 PFS 및 상기 표적 서열은 0nt, 1nt, 2nt, 또는 3nt 거리만큼 떨어져 있음.
- [221] 실시예 28, Cas13 복합체, 부수적 절단 기능
- [222] 실시예 22 내지 실시예 27 중 어느 하나에 있어서, 상기 CRISPR/Cas13 복합체는 부수적 절단 기능 (collateral cleavage function)을 가지며,
- [223] 상기 CRISPR/Cas13 복합체가 상기 표적 핵산과 결합하는 경우, 부수적 절단 기능이 활성화되어 상기 CRISPR/Cas13 복합체의 주변에 존재하는 임의의 핵산을 절단함.
- [224] 실시예 29, Cas13 복합체, 표적핵산 절단기능
- [225] 실시예 22 내지 실시예 28 중 어느 하나에 있어서, 상기 CRISPR/Cas13 복합체는 표적 특이적 절단 기능 (target specific cleavage function)을 가지며,
- [226] 상기 CRISPR/Cas13 복합체가 상기 표적 핵산과 결합하는 경우, 상기 표적 핵산을 절단함.
- [227] 실시예 30, 핵산 종류 한정
- [228] 실시예 28 내지 실시예 29 중 어느 하나에 있어서, 상기 표적 핵산 및 임의의 핵산은 RNA 또는 DNA임.
- [229]
- [230] CRISPR/Cas13 시스템의 각 구성요소를 발현할 수 있는 벡터
- [231] 실시예 31, 발현벡터
- [232] CRISPR/Cas13 시스템의 구성요소를 발현할 수 있는 벡터로, 다음을 포함함:
- [233] 실시예 1 내지 실시예 11 중 어느 하나의 Cas13 단백질을 암호화하는 핵산; 및
- [234] 실시예 12 내지 실시예 21 중 어느 하나의 프로그램 가능한 가이드 RNA를 암호화하는 핵산.
- [235] 실시예 32, 1개의 벡터에 포함

- [236] 실시예 31에 있어서, 상기 Cas13 단백질을 암호화하는 핵산 및 상기 프로그램 가능한 가이드 RNA를 암호화하는 핵산은 한 분자의 핵산에 포함된 것임.
- [237] 실시예 33, 서로 다른 벡터에 포함
- [238] 실시예 31에 있어서, 상기 Cas13 단백질을 암호화하는 핵산 및 상기 프로그램 가능한 가이드 RNA를 암호화하는 핵산은 각각 다른 분자의 핵산에 포함된 것임.
- [239] 실시예 34, 벡터 종류
- [240] 실시예 31 내지 실시예 33 중 어느 하나에 있어서, 상기 벡터는 비바이러스 벡터 및/또는 바이러스 벡터인 것임.
- [241] 실시예 35, 비바이러스 벡터 종류
- [242] 실시예 34에 있어서, 상기 비바이러스 벡터는 플라스미드, 파지, 네이키드 DNA, DNA 복합체, mRNA, 및 PCR 앰플리콘(amplicon) 중 선택된 것임.
- [243] 실시예 36, 바이러스 벡터 종류
- [244] 실시예 34 내지 실시예 35에 있어서, 상기 바이러스 벡터는 레트로바이러스, 렌티바이러스, 아데노바이러스, 아데노-연관 바이러스, 백시니아바이러스, 폭스바이러스 및 단순포진 바이러스 중 선택된 것임.
- [245] 실시예 37, 핵산 종류 한정
- [246] 실시예 31 내지 실시예 36 중 어느 하나에 있어서, Cas13 단백질을 암호화하는 핵산 및 상기 프로그램 가능한 가이드 RNA를 암호화하는 핵산은 각각 독립적으로 DNA 및 RNA 중 선택된 것임.
- [247] 실시예 38, Cas13 단백질을 암호화하는 DNA
- [248] 실시예 37에 있어서, 상기 Cas13 단백질을 암호화하는 핵산은

TTTTGAAAATGTTAAACAGGGCGCAAATACTGAGGGCGAATCT
 CAGGAGTCAATTGACAAGGCACAGAAGCAGGGACTGATTT
 CTTTGTACTTAACCGTTCTATATCTTTTGACAAAGAATCT
 TGTTTATGTAACTCACGCTATTTTCTTGCATTCCATTGT
 CTTGAGCGTGATGCGCAGCTGCTTGGAAGCGGTGCTGGGC
 ATCATGAGCCTTATGTTGCTCTTACTCAGCGCTTTATTAA
 TGAAGATAAGCTCAATGAGCATGCCTGCGAATATCTTAAG
 ACCAATATTGCAAATTCGGATGAATATACAATTAGAATAT
 TCCGCAATAATGCTGCTCACTTGAGTGCTGTTAGAAATGC
 AAATCTGTATATTGACAAGTTGAAGGAATTTAAATCGTAC
 TATGAGATTTATCATTTCTTTCTCAAGAGAATATTTACG
 GTAAATATTGCGTTGATAAGAAATATGTTACAGCCGATGA
 AAATGGAAGTAAAACAATAAGTGTTAAAATTAGCAAGGAT
 TATTGTCCTCAGGTATATATCGACAAGTCGCTTGAATACT
 TTGACAAGCTCAATAAATATGGTACGTATTGCAAGGACTT
 CACGAAGGCACTCAATTCGCCATTCGGCTACAACCTCGCA
 AGATATAAGAATCTGTCTATCGAGGGCTTGTTTGACCGAA

ACCGTCCCGGAGACAAAGGTGAGAACACGTTTGAGGACTAA(서열번호 4)의 DNA 서열을 가짐.

[249]

[250] **CRISPR/Cas13 조성물**

[251] 실시예 39, CRISPR/Cas13 조성물

[252] 다음을 포함하는 CRISPR/Cas13 조성물:

[253] 실시예 1 내지 실시예 11 중 어느 하나의 Cas13 단백질을 암호화하는 핵산; 및

[254] 실시예 12 내지 실시예 21 중 어느 하나의 프로그램 가능한 가이드 RNA, 또는 상기 프로그램 가능한 가이드 RNA를 암호화하는 핵산.

[255] 실시예 40, CRISPR/Cas13 복합체

[256] 실시예 39에 있어서, 상기 CRISPR/Cas13 조성물은 상기 Cas13 단백질 및 상기 프로그램 가능한 가이드 RNA를 포함하고, 상기 Cas13 단백질 및 상기 프로그램 가능한 가이드 RNA가 결합하여 리보뉴클레오프로틴 (ribonucleoprotein)을 형성하고 있음.

[257] 실시예 41, 복합체 한정

[258] 실시예 40에 있어서, 상기 CRISPR/Cas13 조성물은 실시예 22 내지 실시예 30 중 어느 하나의 CRISPR/Cas13 복합체를 포함함.

[259] 실시예 42, CRISPR/Cas13 시스템 구성요소 발현 벡터

[260] 실시예 39에 있어서, 상기 CRISPR/Cas13 조성물은 상기 Cas13 단백질을 암호화하는 핵산 및 상기 프로그램 가능한 가이드 RNA를 암호화하는 핵산을 포함함.

[261] 실시예 43, 발현 벡터 한정

[262] 실시예 42에 있어서, 상기 CRISPR/Cas13 조성물은 실시예 31 내지 실시예 38 중 어느 하나의 CRISPR/Cas13 시스템의 각 구성요소 발현벡터를 포함함.

[263] 실시예 44, 단백질 암호화 핵산 및 가이드 RNA

[264] 실시예 39에 있어서, 상기 CRISPR/Cas13 조성물은 상기 Cas13 단백질을 암호화하는 핵산 및 상기 프로그램 가능한 가이드 RNA를 포함함.

[265] 실시예 45, mRNA 한정

[266] 실시예 44에 있어서, 상기 Cas13 단백질을 암호화하는 핵산은 mRNA임.

[267]

[268] **표적 핵산 검출용 조성물**

[269] 실시예 46, 표적 핵산 검출용 조성물

[270] 다음을 포함하는 검출 시약:

[271] 프로브 핵산을 포함하는 리포터,

[272] 여기서, 상기 프로브 핵산이 절단되는 경우, 상기 리포터가 검출 가능한 신호를 생성함.

[273] 실시예 47, 검출 가능한 신호 한정

[274] 실시예 46에 있어서, 상기 검출 가능한 신호는 형광 신호임.

[275]

[276] 비표적 핵산 절단 방법/용도

[277] 실시예 48, 비표적 핵산 절단 방법

[278] 다음을 포함하는, CRISPR/Cas13 시스템을 사용하여 비표적 핵산을 절단하는 방법:

[279] 실시예 22 내지 실시예 30 중 어느 하나의 CRISPR/Cas13 복합체를 표적 핵산 및 비표적 핵산과 접촉시키는 과정,

[280] 여기서, 상기 표적 핵산은 1) 미리 결정된 표적 서열, 및 2) 상기 CRISPR/Cas13 복합체의 Cas13 단백질이 인식하는 PFS를 가지며,

[281] 상기 CRISPR/Cas13 복합체의 프로그램 가능한 가이드 RNA의 가이드 도메인은 상기 미리 결정된 표적 서열을 표적할 수 있도록 설계된 것이고,

[282] 상기 비표적 핵산은 상기 표적 핵산과 상이한 서열을 가지고,

[283] 상기 CRISPR/Cas13 복합체가 상기 표적 핵산과 접촉한 결과, 부수적 절단 기능이 활성화되어 상기 비표적 핵산이 절단됨.

[284] 실시예 49, 접촉 순서

[285] 실시예 48에 있어서, 상기 CRISPR/Cas13 복합체를 표적 핵산 및 비표적 핵산과 접촉시키는 과정은 다음 중 선택된 순서로 수행됨:

[286] (a) 상기 CRISPR/Cas13 복합체를 상기 표적 핵산과 접촉시킨 후, 이를 상기 비표적 핵산과 접촉시킴;

[287] (b) 상기 CRISPR/Cas13 복합체를 상기 비표적 핵산과 접촉시킨 후, 이를 상기 표적 핵산과 접촉시킴; 및

[288] (c) 상기 CRISPR/Cas13 복합체를 상기 표적 핵산 및 비표적 핵산과 동시에 접촉시킴.

[289] 실시예 50, 비표적 핵산 절단 용도

[290] 실시예 22 내지 실시예 30 중 어느 하나의 CRISPR/Cas13 복합체, 실시예 31 내지 실시예 38 중 어느 하나의 CRISPR/Cas13 시스템의 구성요소 발현벡터, 및/또는 실시예 39 내지 실시예 45 중 어느 하나의 CRISPR/Cas13 조성물을 실시예 48 내지 실시예 49 중 어느 하나의 비표적 핵산 절단 방법에 사용하는 용도.

[291]

[292] 표적 핵산 검출 방법/용도

[293] 실시예 51, 표적 핵산 검출 방법

[294] CRISPR/Cas13 시스템을 사용하여 표적 핵산을 검출하는 방법으로, 다음을 포함함:

[295] (a) 샘플, 실시예 22 내지 실시예 30 중 어느 하나의 CRISPR/Cas13 복합체, 및 실시예 46 내지 실시예 47 중 어느 하나의 검출 시약을 섞거나 (blend), 혼합하거나 (mix), 반응시키거나 (react), 및/또는 접촉시키는 (contact) 과정,

[296] 여기서, 상기 표적 핵산은 1) 미리 결정된 표적 서열, 및 2) 상기 CRISPR/Cas13 복합체의 Cas13 단백질이 인식하는 PFS를 가지며,

- [297] 상기 CRISPR/Cas13 복합체의 프로그램 가능한 가이드 RNA의 가이드 도메인은 상기 미리 결정된 표적 서열을 표적할 수 있도록 설계된 것이고,
- [298] 상기 샘플 내 상기 표적 핵산이 존재하는 경우, 상기 표적 핵산이 상기 CRISPR/Cas13 복합체와 결합하여 부수적 절단 활성이 활성화되며, 이에 따라 상기 리포터에 포함된 프로브 핵산이 상기 Cas13 복합체에 의해 절단될 수 있으며,
- [299] 상기 검출 시약의 리포터에 포함된 프로브 핵산이 절단되는 경우, 상기 리포터는 검출 가능한 신호를 생성함; 및
- [300] (b) 상기 혼합물로부터 상기 검출 가능한 신호를 관찰하거나 (observe), 측정하거나 (measure) 및/또는 검출하는 (detect) 과정,
- [301] 여기서, 상기 검출 가능한 신호로부터 상기 표적 핵산의 존재 및/또는 샘플 내 존재하는 양을 도출하거나 (derive), 알아내거나 (find out), 측정하거나 (measure), 결정하거나 (determine), 검출하거나 (detect) 및/또는 분석할 (analyze) 수 있음.
- [302] 실시예 52, 샘플, 복합체, 및 검출 시약 접촉 순서
- [303] 실시예 51에 있어서, 상기 샘플, 실시예 22 내지 실시예 30 중 어느 하나의 CRISPR/Cas13 복합체, 및 실시예 46 내지 실시예 47 중 어느 하나의 검출 시약을 섞거나 (blend), 혼합하거나 (mix), 반응시키거나 (react), 및/또는 접촉시키는 (contact) 과정은 다음 중 선택된 순서로 수행됨:
- [304] (1) 상기 샘플 및 상기 CRISPR/Cas13 복합체를 섞거나 (blend), 혼합하거나 (mix), 반응시키거나 (react), 및/또는 접촉시킨 (contact) 후, 상기 검출 시약을 섞거나 (blend), 혼합하거나 (mix), 반응시키거나 (react), 및/또는 접촉시킴 (contact);
- [305] (2) 상기 샘플 및 상기 검출 시약을 섞거나 (blend), 혼합하거나 (mix), 반응시키거나 (react), 및/또는 접촉시킨 (contact) 후, 상기 CRISPR/Cas13 복합체를 섞거나 (blend), 혼합하거나 (mix), 반응시키거나 (react), 및/또는 접촉시킴 (contact);
- [306] (3) 상기 CRISPR/Cas13 복합체 및 상기 검출 시약을 섞거나 (blend), 혼합하거나 (mix), 반응시키거나 (react), 및/또는 접촉시킨 (contact) 후, 상기 샘플을 섞거나 (blend), 혼합하거나 (mix), 반응시키거나 (react), 및/또는 접촉시킴 (contact); 및
- [307] (4) 상기 샘플, 상기 CRISPR/Cas13 복합체, 및 상기 검출 시약을 동시에 섞거나 (blend), 혼합하거나 (mix), 반응시키거나 (react), 및/또는 접촉시킴 (contact).
- [308] 실시예 53, COVID-19 검출 방법
- [309] 실시예 51 내지 실시예 52 중 어느 하나에 있어서, 상기 CRISPR/Cas13 시스템을 사용하여 표적 핵산을 검출하는 방법은 상기 샘플 내 COVID-19 바이러스의 핵산이 포함되었는지 여부를 검출하는 방법임.
- [310] 실시예 54, COVID-19 N-gene, E-gene 검출 방법
- [311] 실시예 53에 있어서, 상기 표적 핵산은 ucugauaauggacccccaaaucagcgaaaugcaccgccauuacguuugggacccucagauucaacuggcaguaaccagaauggagaacgcagugggcgcgcaucaaacaacgucggccccaagguuuacccaauaaucugcgucuugguuaccgcucucacucaacauggcaaggaagaccuuaaaaucccucgaggacaaggcguuccaa uuaacaccaauagcaguccagaugaccaaauuggcuacuaccgaagagcuaccagacgaa

uucgugggugacgguaaaaugaaagaucucaguccaagaugguauuuucuacuaccuag
gaacuggggccagaagcugggacucccuauuggugcuaacaaagacggcaucauagggguugca
acugaggggagccuugaauacaccaaagaucacauugggcacccgcaauccugcuaacaau
gcugcaaucgugcuacaacuuccucaaaggaacaacaauugccaaaaggcuucuaacgcagaa
gggagcagagggcggcagucaagccucucucguuccucaucacguagucgcaacaguuca
agaaauucauccagggcagcaguuaggggaaccuccugcuagaauaggcuggcaauaggcgg
ugaugcugcucuuugcuuugcugcugcuugacagauugaaccagcuugagagcaaaauguc
ugguaaaggccaacaacaacaaggccaaacugucacuaagaaucugcugcugagggcuuc
uaagaagccucggcaaaaacguacugccacuaaagcauacaauguaacacaagcuuucgg
cagacgugguccagaacaaacccaaggaaaauuuggggaccaggaacuaaauagacaagg
aacugauuacaaacauuggccgcaauuugcacaauuugcccccagcgcucucagcguucuu
cggaauugcgcgcgauuggcauggaagaaaaa(서열번호 5) 및/또는
uacucauucguuucgggaagagacagguacguuaauaguuaauagcguacuucuu
uuuucugcuuucgugguauuucugcuaguuaacacuagccauccuuacugcgcucucgauug
ugugcguacugcugcaauuuguaaacgugagucuuuguaaaaccuucuuuuuacguuuac
ucucguguuaaaaaucugaauucuuucagaguuccugaucuucuggucuaaaaaa(서열번호 6)임.

[312] 실시예 55, 표적 서열 한정

[313] 실시예 54에 있어서, 상기 표적 핵산의 표적 서열은 CGCAUUACGUUUGGUGGACC(서열번호 57), UUCAACUGGCAGUAACCAGA(서열번호 58), UUACAAACAUUGGCCGCAAA(서열번호 59), GGGAGCCUUGAAUACACCAA(서열번호 60), CACAUUGGCACCCGCAAUCC(서열번호 61), AAUGCUGCAAUCGUGCUACA(서열번호 62), GGGGAACUUCUCCUGCUAGA(서열번호 63), CUUUGCUGCUGCUUGACAGA(서열번호 64), CAGCUUGAGAGCAAAAUGUC(서열번호 65), GAUUCAACUGGCAGUAACCA(서열번호 66), CACAUUGGCACCCGCAAUCCU(서열번호 67), AAUGCUGCAAUCGUGCUACAA(서열번호 68), UUGGCCGCAAAUUGCACAAUUUG(서열번호 69), AGGAACUGAUUACAAACAUUGGC(서열번호 70), GGGACCAGGAACUAAUCAGACAA(서열번호 71), CUAGCCAUCCUUACUGCG(서열번호 72), CGGAAGAGACAGGUACGUUA(서열번호 73), GUUACACUAGCCAUCCUAC(서열번호 74), UGUGCGUACUGCUGCAAUAUU(서열번호 75), 및 CAAUAUUGUUAACGUGAGUCUU(서열번호 76) 중 선택된 핵산 서열임.

[314] 실시예 56, 가이드 도메인 한정

[315] 실시예 54에 있어서, 상기 CRISPR/Cas13 복합체의 프로그램 가능한 가이드 RNA의 가이드 도메인은 ggUccaccaaacgUaaUgcg(서열번호 37), UCUGGUUACUGCCAGUUGAA(서열번호 38), UUUgcggccaaUgUUUgUaa(서열번호 39), UUGGUGUAUUCAAGGCUCCC(서열번호 40), GGAUUGCGGGUGCCAAUGUG(서열번호 41), UGUAGCACGAUUGCAGCAUU(서열번호 42), UCUAGCAGGAGAAGUUCCCC(서열번호 43), UCUGUCAAGCAGCAGCAAAG(서열번호 44), GACAUUUUGCUCUCAAGCUG(서열번호 45), UggUUacUgccagUUgaaUc(서열번호 46), aggaUUgcgggUgccaaUgUg(서열번호 47), UUgUagcacgaUUgcagcaUU(서열번호 48), CAAAUUGUGCAAUUUGCGGCCAA(서열번호 49), GCCAAUGUUUGUAAUCAGUUCCU(서열번호 50), UUGUCUGAUUAGUUCCUGGUCCC(서열번호 51), cgcagUaaggaUggcUag(서열번호 52), UaacgUaccUgUcUcUUccg(서열번호 53), gUaaggaUggcUagUgUaac(서열번호 54), aaUaUUgcagcagUacgcaca(서열번호 55), 및 aagacUcacgUUaacaUaUUg(서열번호 56) 중 선택된 핵산 서열을 가짐.

[316] 실시예 57, 프로그램 가능한 가이드 RNA 한정

[317] 실시예 54에 있어서, 상기 CRISPR/Cas13 복합체의 프로그램 가능한 가이드 RNA는 GAAACGUACUACACCCUUUUUGUAAGGG UCUGAAACCUggUUacUgccagUUgaaUc(서열번호 16), GAAACGUACUACACCCUUUU UGUAAGGGUCUGAAACCAggaUUgcgggUgccaaUgUg(서열번호 17), GAAACGUACUACACCCUUUUUGUAAGGGUCUGAAACCUUgUagcacgaUUgcagcaUU(서열번호 18), GAAACGUACUACACCCUUUUUG UAAGGGUCUGAAACCCAAAUUGUGCAAUUUGCGGCCAA(서열번호 19), GAAACGUACUACACCCUUUUUGUAAGGGUCU GAAACCGCCAAUGUUUGUAAUCAGUUCCU(서열번호 20), GAAACGUACUACACCCUUUUUGUAAGGGUCUGAAACCUUG UCUGAUUAGUUCCUGGUCCC(서열번호 21), GAAACGUACUACACCCUUUUUGUAAGGGUCUGAAACCGgUccaccaaac gUaaUgcg(서열번호 22), GAAACGUACUACACCCUUUUU GUAAGGGUCUGAAACCUCUGGUUACUGCCAGUUGAA(서열번호 23), GAAACGUACUACACCCUUUUUGUAAGGGUCUGA AACCUUUgcggccaaUgUUUgUaa(서열번호 24), GAAACGUACUACACCCUUUUUGUAA GGGUCUGAAACCUUGGUGUAUUCAAGGCUCCC(서열번호 25), GAAACGUACUACACCCUUUUUGUAAGGGUCUGAAACC GGAUUGCGGGUGCCAAUGUG(서열번호 26),

GAAACGUACUACACCCUUUUUGUAAGGGUCUGAAACCUGUAGCACGAUU
GCAGCAUU(서열번호 27), GAAACGUACUACACCCUUUUU
GUAAGGGUCUGAAACCUCUAGCAGGAGAAGUUCCCC(서열
번호 28), GAAACGUACUACACCCUUUUUGUAAGGGUCUGA
AACCUCUGUCAAGCAGCAGCAAAG(서열번
호 29), GAAACGUACUACACCCUUUUUGUAA
GGGUCUGAAACCGACAUUUUGCUCUCAAGCUG(서열번호
30), GAAACGUACUACACCCUUUUUGUAAGGGUCUGAAACC
UaacgUaccUgUcUcUUccg(서열번호 32),
GAAACGUACUACACCCUUUUUGUAAGGGUCUGAAACCgUaaggaUggcU
agUgUaac(서열번호 33), GAAACGUACUACACCCUUUUU
GUAAGGGUCUGAAACCaaUaUUgcagcagUacgcaca(서열번호 34),
GAAACGUACUACACCCUUUUUGUAAGGGUCUGAAACCaaagacUcagcUUaac
aaUaUUg(서열번호 35), 및 GAAACGUACUACACCCUUUU
UGUAAGGGUCUGAAACCcgcagUaaggaUggcUag(서열번호 36) 중 선택된 핵산
서열을 가짐.

[318] 실시예 58, 표적 핵산 검출 용도

[319] 실시예 22 내지 실시예 30 중 어느 하나의 CRISPR/Cas13 복합체, 실시예 31 내
지 실시예 38 중 어느 하나의 CRISPR/Cas13 시스템의 구성요소 발현벡터, 및/또
는 실시예 39 내지 실시예 45 중 어느 하나의 CRISPR/Cas13 조성물을 실시예 51
내지 실시예 57 중 어느 하나의 표적 핵산 검출 방법에 사용하는 용도.

[320]

[321] 실험예

[322] 이하, 실험예 및 실시예를 통해 본 명세서가 제공하는 발명에 대해 더욱 상세히
설명한다. 이들 실시예는 오로지 본 명세서에 의해 개시되는 내용을 예시하기 위
한 것으로, 본 명세서에 의해 개시되는 내용의 범위가 이들 실시예에 의해 제한
되는 것으로 해석되지 않는 것은 당업계에서 통상의 지식을 가진 자에게 있어서
자명할 것이다.

[323]

[324] 실험예 1. 실험방법 및 재료

[325] 실험예 1.1. 공지 DB로부터 신규 CRISPR/Cas13 시스템 서열 특정

[326] NCBI (National Center for Biotechnology Information)의 데이터베이스에 공개된
소 위의 메타지놈 (metagenome) 데이터를 사용하였다. 상기 NGS 데이터를 가지
고, 다음과 같은 방법으로 CRISPR/Cas13 시스템을 특정하였다:

[327] (1) MEGAHIT v.1.2.9(NGS assembly software)로 시퀀스 데이터를 어셈블리하여
미생물의 게놈 정보를 도출하였다. (Li D, Liu CM, Luo R, Sadakane K, Lam TW.
MEGAHIT: an ultra-fast single-node solution for large and complex metagenomics

assembly via succinct de Bruijn graph. Bioinformatics. 2015 May 15;31(10):1674-6. doi: 10.1093/bioinformatics/btv033. Epub 2015 Jan 20. PMID: 25609793).

- [328] (2) 공지된 Cas13 서열 (예를 들어, Lachnospiraceae bacterium 유래 Cas13) 정보를 참고하고, (BLAST) 툴을 사용하여 상동성(homology) 분석을 통해 상기 미생물의 게놈 정보에 포함된 Cas13 단백질 후보군을 특정하였다.
- [329] (3) (2)와 동일한 방법으로, 각 Cas13 단백질 후보군에 대한 가이드 RNA 후보군을 특정하였다.
- [330] 이하, 상기 방법으로 도출된 CRISPR/Cas13 시스템의 서열정보를 이용하여 실험을 진행하였다.
- [331] 상기 방법으로 특정된 CRISPR/Cas13 시스템의 각 정보는 다음과 같다:
- [332] [표1]

Subject	Sequence	SEQ ID NO
Cas13 protein	VSKNDNIKSKAKALGLKSTFQVGDEVVMTSFGKGNKA IVEKIVRGTDVQSVPTPEPNFSAEIEGKKFDLVGRAHIQT KSDNPQYSKKRTGDDMIGAKAALEKRFFGGTFDDNIH IQLAYNVLDIEKILSVHINNIVYTLNNIRRKDNAEDDDF IGYMSTRNDYDTFIEPRKHNISEDAAKSIDKSRSASFEEY LQPPVKDCLHYFGNTFFAPREIEKTYTDNRGFERKKKV TVNSLIDEKEIYYIFALLGGLRQFCTHDNKSGRNWLYSL EENGINSDAKAVLDKYYNsAVARIDESFVDNASKTNFK LIFNAMDVSDEALQDNIKAFYKFTVCKSFKNMGFSIK KLREQLLELPEYEGLDKHYDSVRSKLYQIMDFVIYLS FKDEKFKKDNEEKINNIVNELRATLNEEDKGRVYASYA ERMKSELKPAIARLKSDIDKIKDSRVKEFELDASVKYRL SKVVESVRLKDRATYFTKLIYLTTLFLDGKEINDLLTTL IHQFENIASFIDVMNDRGIDCRFSDGYKLFESSKQIAFEL RNVNSFARMTRTSKDDENATHMMYIDAAEILGTDYTE EQIEEHLNLEKKRMIPGTTKADMNFRNFIINNVIKSSRF NYLVRYSNPKKIRALADNEGVIKRVLGELPDQAQIDRYT LLCGFNPDAQRQEKTDKLAKAITGLRFNDFENVKQGA NTEGESQESIDKAQKQGLISLYLTVLYLLTKNLVYVNS RYFLAFHCLERDAQLLGSGAGHHEPYVALTQRFINEDK LNEHACEYLKTNIANsDEYTIRIFRNNAHLsAVRNAN LYIDKLKEFKSYEYIHFSLSQENIYGKYCVDKKYVTAD ENGSKTISVKISKDYCPQVYIDKSLEYFDKLNKYGTYC	1

	KDFTKALNSPFGYNLARYKNLSIEGLFDRNRPGDKGEN TFED	
Direct repeat	GAAACGUACUACACCCUUUUUGUAAGGGUCUGAAA CC	2

- [333] 실험예 1.2. 신규 Cas13 단백질 발현 벡터 제조
- [334] 실험예 1.1에서 발굴한 신규 Cas13 단백질의 아미노산 서열에 대해, 대장균 (E. Coli) 코돈 최적화한 핵산 서열을 특정하고, 이를 pET28 벡터에 클로닝하여 신규 Cas13 단백질 발현 벡터를 제조하였다.
- [335] 실험예 1.3. 신규 Cas13 단백질 제조 및 정제
- [336] 실험예 1.2에서 제조된 신규 Cas13 단백질 발현 벡터를 세포 내 유도하여, 다양한 성장조건 (배지, 온도, 유도조건 등)하에서 다양한 대장균 균주(NiCo21(DE3), T7 Express lysY/Iq, NEB® Express Iq) 내에서 신규 Cas13 단백질을 제조하였고, 제조된 양을 SDS-PAGE 분석을 통해 테스트하였다.
- [337] 상기 테스트 결과를 통해, 플라스크 스케일 생산을 위한 최적화된 성장조건 및 균주가 선택되었다.
- [338] 구체적으로, 상기 대장균 세포를 제조자의 지시에 따라 실험예 1.2에서 제조된 플라스미드 벡터로 형질전환시켰다. 단일 콜로니는 37°C에서 100ug ml⁻¹의 암피실린을 함유하는 Luria-Bertani 액체배지에서 하룻밤 성장시켰다. 세포를 250ml의 동일한 배지에 1:200으로 희석하고 OD600이 0.70 내지 0.75가 될 때까지 37°C에서 성장시켰다. 배양물을 실온에서 1시간 동안 인큐베이션하고, 23°C에서 진탕 (220rpm)하면서 16-18시간의 인큐베이션에 의해 0.5mM 이소프로필- β -D-1-티오갈락토피라노시드로 단백질 발현을 유도하였다.
- [339] 상기 최적화된 성장조건 하 대장균이 신규 Cas13 단백질을 생산하도록 유도한 후, 세포를 ~4000g에서 20분동안 원심분리하여 펠릿화하고 냉장고에서 -20°C에서 보관하였다.
- [340] 신규 Cas13 단백질 정제 전, 냉동된 세포를 초음파 처리 완충액(25°C에서 20mM Tris-HCl, pH 7.5, 0.5M NaCl, 5% 글리세롤, 0.2% Tween20, 1mM DTT, 1mM EDTA, 1x Halt Protease Inhibitor Cocktail (Fisher Scientific), 40 mM 이미다졸)에 펠릿 1g 당 5ml의 버퍼를 사용하여 재현탁하였다.
- [341] 상기 초음파 처리 완충액에 현탁한 펠릿을 Qsonica Microtip Probe 420-A를 사용하여, 샘플 30ml 당 30% amp, 5초 ON/15초 OFF 조건으로, 얼음 위에서, 4 x 2분 처리 (과열을 방지하기 위하여 간격을 두고 처리함)하여 세포를 파쇄하였다.
- [342] 상기 초음파 처리가 완료된 샘플을 40,000g에서 1시간 원심분리하여 세포 파편을 제거하였다.
- [343] 상기 원심분리 결과의 상청액을 0.2 μ m PES 주사기 필터 (Fisher Scientific)를 통해 여과하였고, 25°C, 0.5M NaCl, 40mM 이미다졸 완충액에서 20mM Tris-HCl pH 7.5로 평형화된 Ni²⁺-충전 HiTrap 킬레이트 HP 컬럼(Cytiva)에 로드하였다.

- [344] 상기 컬럼을 25°C, 0.5M NaCl에서 20mM Tris-HCl, pH 7.5에서, 40mM에서 700mM까지 농도가 증가하는 선형 구배의 이미다졸에 용출시켜 신규 Cas13 단백질을 수득하였다.
- [345] 실험예 1.4. 프로그래밍 가능한 가이드 RNA 제조
- [346] 실험예 1.1에서 특정된 신규 CRISPR/Cas13 시스템의 프로그래밍 가능한 가이드 RNA (이하, crRNA로도 지칭함)는 TranscriptAid T7 High Yield Transcription kit (Thermo fisher) 또는 HiScribe T7 Quick High Yield RNA Synthesis Kits (New England Biolabs)를 사용하여 시험관 외 전사 (in vitro Transcription)를 통해 합성되었다.
- [347] 상기 시험관 외 전사를 위해, 상기 crRNA 암호화 서열의 근위 말단에 T7 프로모터를 함유하는 단편을 프라이머를 주형으로 사용하여 PCR에 의해 생성하거나, T7 프라이머 올리고핵산을 단일 가닥 주형 올리고핵산에 어닐링하였다.
- [348] 제조된 crRNA를 RNeasy MiniElute Cleanup 키트(Qiagen) 또는 Monarch RNA Cleanup Kit(50µg)(New England Biolabs)를 사용하여 정제하였다.
- [349] 상기 시험관 외 전사에 사용된 프라이머는 다음 표와 같다:
- [350] [표2]
- 신규 CRISPR/Cas13 시스템의 프로그래밍 가능한 가이드 RNA를 합성하기 위해 사용된 프라이머

Label	Sequence	SEQ ID NO
crRNA Forward primer	GAAATTAATACGACTCACTATAGGAAACGTA CTACACCCTTTTTGTAAGGGTCTGAAACC	77
crRNA Example 2 .1 Reverse primer	GATTCAACTGGCAGTAACCAGGTTTCAGACCC TTACAAAAAGGG	78
crRNA Example 2 .2 Reverse primer	CACATTGGCACCCGCAATCCTGGTTTCAGACC CTTACAAAAAGGG	79
crRNA Example 2 .3 Reverse primer	AATGCTGCAATCGTGCTACAAGGTTTCAGACC CTTACAAAAAGGG	80
crRNA Example 2 .4 Reverse primer	TTGGCCGCAAATTGCACAATTTGGGTTTCAGA CCCTTACAAAAAGGG	81
crRNA Example 2 .5 Reverse primer	AGGAACTGATTACAAACATTGGCGGTTTCAGA CCCTTACAAAAAGGG	82
crRNA Example 2 .6 Reverse primer	GGGACCAGGAACTAATCAGACAAGGTTTCAG ACCCTTACAAAAAGGG	83

crRNA Example 3 .1 Reverse primer	CGGAAGAGACAGGTACGTTAGGTTTCAGACC CTTACAAAAAGGG	84
crRNA Example 3 .2 Reverse primer	GTTACACTAGCCATCCTTACGGTTTCAGACCC TTACAAAAAGGG	85
crRNA Example 3 .3 Reverse primer	TGTGCGTACTGCTGCAATATTGGTTTCAGACC CTTACAAAAAGGG	86
crRNA Example 3 .4 Reverse primer	CAATATTGTTAACGTGAGTCTTGGTTTCAGAC CCTTACAAAAAGGG	87

[351] 실험예 1.5. 신규 CRISPR/Cas13 복합체 제조

[352] 신규 CRISPR/Cas13 복합체를 실험예 1.3에 의해 제조된 40 nM의 Cas13 단백질 및 실험예 1.4에 의해 제조된 40nM의 crRNA를 50mM NaCl, 10mM Tris-HCl, 10mM MgCl₂, 100ug/mL BSA (pH=7.9)를 함유하는 NEB r2.1 완충액에서 실온에서 15분 동안 배양하여 제조하였다.

[353] 실험예 1.6. CRISPR/Cas13 복합체를 이용한 표적핵산 검출 방법

[354] 1x NEB 2.0 buffer, 0.6 U/uL의 Rnase Inhibitor, 12.5 nM의 Rnase alert (IDT reporter) 실험예에 따라 다양한 농도(0.1 - 100 ng/uL)의 표적 RNA, 및 뉴클레아제를 포함하지 않는 정제수 100 uL를 혼합하여 반응 용액을 제조하였다.

[355] 상기 반응 용액에 실험예 1.5에 의해 제조된 신규 CRISPR/Cas13 복합체를 첨가하였다.

[356] 상기 혼합물을 384-웰(SPL)에 로드하고 형광 플레이트 판독기(TECAN, Infinite 200 Pro M Plex)에서 37°C에서 최대 1시간 동안 배양하고 3분마다 형광 측정을 수행하였다 (λ_{ex} : 535 nm; λ_{em} : 485 nm, gain: -135).

[357]

[358] 실험예 2. 신규 CRISPR/Cas13 복합체를 이용한 표적핵산 검출 실험 1

[359] 실험예 2.1. 가이드 도메인 서열에 따른 표적 핵산 검출 실험

[360] 실험예 1.5에 따라 제조된 신규 CRISPR/Cas13 복합체가 부수적 절단 활성을 가지고, 나아가 표적 핵산 검출에 활용할 수 있는지를 확인하기 위해, 실험예 1.6에 따라 표적 핵산 검출 실험을 진행하였다.

[361] 표적 핵산은 COVID-19의 N-gene에 해당되며, 서열은 다음과 같다:

[362] ucugauaauggacccccaaaucagcgaaaugcaccgcauuacguuugguggaccuca
gauucaacuggcaguaaccagauggagaacgcaguggggcgcgaucaaaacaacgucgg
ccccaaagguuuacccaauaauacugcgucuugguucaccgcucucacucaacaugggcaag
gaagaccuuuuuuuccucgaggacaaggcgauccaauuaacaccaauagcaguccagau
gaccaaauuggcuacuaccgaagagcuaccagacgaauucgugguggugacgguaaaaug
aaagaucucaguccaagaugguauuucuaacuaggaacuggggccagaagcuggacuc
ccuauuggugcuaacaaagacggcaucauagggguugcaacugaggaggccuugaauacacc
aaaagaucacauuggcaccgcaauccugcuaacaaugcugcaauccugcuaacaacuucc

ucaaggaacaacauugccaaaaggcuucucacgcagaagggagcagaggcggcagucaagc
 cucuucucguuccucaucacguagucgcaacaguucaagaaaucaacuccaggcagcag
 uaggggaaccuccugcuagaauaggcuggcgaauaggcggugaugcugcucuugcuuugcugc
 ugcuuagacagauugaaccagcuugagagcaaaaugucugguaaaggccaacaacaacag
 gccaaacugucacuaagaaaucugcugcugaggcuucuaagaagccucggcaaaaacgua
 cugccacuaaagcauacauguaacacaagcuuucggcagacgugguccagaacaacccc
 aaggaaaauuuuggggaccaggaacuaucagacaaggaacugauuacaaacauuggccgc
 aaauugcacaaaauuugccccagcgcucagcguucucggaugucgcgcgauuggcauggaagaaaaa(서열
 번호 5)

[363] 실험예 2.1에서 사용한 신규 CRISPR/Cas13 복합체의 각 구성은 다음 표에 나타
 내었다:

[364] 각 실험의 음성 대조군으로, 프로그래밍 가능한 가이드 RNA 없이, Cas13 단백
 질만을 첨가하였다.

[365] [표3]

실험예 2에서 사용한 신규 CRISPR/Cas13 복합체의 각 구성

Label	Cas13 prot ein (SEQ ID N O)	Direct Rep eat (SEQ ID N O)	Guide domain	PFS
Example 2. 1	1	2	TGGTTACTGCCAGTTGA ATC	G
Example 2. 2			AGGATTGCGGGTGCCAA TGTG	G
Example 2. 3			TTGTAGCACGATTGCAG CATT	C
Example 2. 4			CAAATTGTGCAATTTGC GGCCAA	C
Example 2. 5			GCCAATGTTTGTAAATCA GTTCTT	C
Example 2. 6			TTGTCTGATTAGTTCCTG GTCCC	G

[366] 상기 실험 결과를 도 1 내지 도 6에 나타내었다:

[367] 실험 결과, 상기 신규 CRISPR/Cas13 복합체는 1) 다양한 서열의 가이드 도메인
 이 모두 표적 핵산과 결합하여 부수적 절단 기능이 활성화되며, 2) 표적 핵산 검
 출 용도로 사용할 수 있을 정도로 충분한 부수적 절단 활성을 보이는 것을 볼 수
 있다.

- [368] 실험예 2.2. 농도에 따른 표적 핵산 검출 실험
- [369] 실험예 1.5에 따라 제조된 신규 CRISPR/Cas13 복합체가 부수적 절단 활성을 가지고, 나아가 표적 핵산 검출에 활용할 수 있는지를 확인하기 위해, 전술한 COVID-19의 N-gene을 표적 핵산으로 하여, 실험예 1.6에 따라 표적 핵산 검출 실험을 진행하였다.
- [370] 실험예 2에서 사용한 신규 CRISPR/Cas13 복합체의 각 구성은 다음 표에 나타내었다:
- [371] [표4]
실험예 2.2에서 사용한 신규 CRISPR/Cas13 복합체의 각 구성 및 농도

Label	Cas13 protein (SEQ ID NO)	Direct Repeat (SEQ ID NO)	Guide domain	PFS	Concentration (ng/uL)
Example 2 .2.1	1	2	AGGATTGCGGGTGCC AATGTG	G	0.05
Example 2 .2.2					0.1
Example 2 .2.3					0.25
Example 2 .2.4					0.5
Example 2 .2.5					1
Example 2 .5.1			GCCAATGTTTGTAATC AGTTCCT	C	0.05
Example 2 .5.2					0.1
Example 2 .5.3					0.25
Example 2 .5.4					0.5
Example 2 .5.5					1

- [372] 각 실험의 음성 대조군으로, 프로그래밍 가능한 가이드 RNA 없이, Cas13 단백질만을 첨가하였다.

- [373] 상기 실험 결과를 도 7 내지 도 8에 나타내었다:
- [374] 실험 결과, 상기 신규 CRISPR/Cas13 복합체는 1) 적은 농도로도 표적 핵산과 결합하여 부수적 절단 기능이 활성화되며, 2) 표적 핵산 검출 용도로 사용할 수 있을 정도로 충분한 부수적 절단 활성을 보이는 것을 볼 수 있다.
- [375]
- [376] **실험예 3. 신규 CRISPR/Cas13 복합체를 이용한 표적핵산 검출 실험 2**
- [377] **실험예 3.1. 가이드 도메인 서열에 따른 표적 핵산 검출 실험**
- [378] 실험예 1.5에 따라 제조된 신규 CRISPR/Cas13 복합체가 부수적 절단 활성을 가지고, 나아가 표적 핵산 검출에 활용할 수 있는지를 확인하기 위해, 실험예 1.6에 따라 표적 핵산 검출 실험을 진행하였다.
- [379] 실험예 3.1에서 사용한 신규 CRISPR/Cas13 복합체의 각 구성은 다음 표에 나타내었다:
- [380] 표적 핵산은 COVID-19의 E-gene에 해당되며, 서열은 다음과 같다:
- [381] uacucauucguuucggaagagacagguacguuaauaguuaauagcguacuucuuuuucuu
gcuuucgugguauucugcuaguuaacacuaagccauccuacugcgcuucgauugugugcg
uacugcgcaauauuguuaacgugagucuuguaaaaccuucuuuuuacguuuacucucgu
guuaaaaaucugaauucuuucagaguuccugaucuuucuggucuaaaaaa(서열번호 6)
- [382] [표5]
실험예 3에서 사용한 신규 CRISPR/Cas13 복합체의 각 구성

Label	Cas13 prot ein (SEQ ID N O)	Direct Rep eat (SEQ ID N O)	Guide domain	PFS
Example 3. 1	1	2	TAACGTACCTGTCTCTTC CG	A
Example 3. 2			GTAAGGATGGCTAGTGT AAC	T
Example 3. 3			AATATTGCAGCAGTACG CACA	G
Example 3. 4			AAGACTCACGTTAACAA TATTG	C

- [383] 상기 실험 결과를 도 9 내지 도 11에 나타내었다:
- [384] 여기서, 상기 Example 3.4의 경우, 반응 직후 형광 신호 강도 측정 범위를 넘어서었으며, 따로 그래프를 도시하지는 않았다.
- [385] 실험 결과, 상기 신규 CRISPR/Cas13 복합체는 1) 다양한 서열의 가이드 도메인이 모두 표적 핵산과 결합하여 부수적 절단 기능이 활성화되며, 2) 표적 핵

산 검출 용도로 사용할 수 있을 정도로 충분한 부수적 절단 활성을 보이며, 3) Protospacer Flanking Sequence에 대한 의존 없이, 가이드 도메인과 상보적인 서열의 존재 만으로 기능한다는 것을 볼 수 있다.

[386] 실험예 3.2. 농도에 따른 표적 핵산 검출 실험

[387] 실험예 1.5에 따라 제조된 신규 CRISPR/Cas13 복합체가 부수적 절단 활성을 가지고, 나아가 표적 핵산 검출에 활용할 수 있는 지를 확인하기 위해, 전술한 COVID-19의 E-gene을 표적 핵산으로 하여, 실험예 1.6에 따라 표적 핵산 검출 실험을 진행하였다.

[388] 실험예 3.2에서 사용한 신규 CRISPR/Cas13 복합체의 각 구성은 다음 표에 나타내었다:

[389] [표6]
 실험예 2.2에서 사용한 신규 CRISPR/Cas13 복합체의 각 구성 및 농도

Label	Cas13 protein (SEQ ID NO)	Direct Repeat (SEQ ID NO)	Guide domain	PFS	Concentration (ng/uL)
Example 3 .3.1	1	2	AATATTGCAGCAGTA CGCACA	G	0.05
Example 3 .3.2					0.1
Example 3 .3.3					0.25
Example 3 .3.4					0.5
Example 3 .3.5					1
Example 3 .4.1			AAGACTCACGTTAAC AATATTG	C	0.05
Example 3 .4.2					0.1
Example 3 .4.3					0.25
Example 3 .4.4					0.5

Example 3					1
.4.5					

- [390] 각 실험의 음성 대조군으로, 프로그래밍 가능한 가이드 RNA 없이, Cas13 단백질을 첨가하였다.
- [391] 상기 실험 결과를 도 12 내지 도 13에 나타내었다:
- [392] 여기서, Example 3.4.5의 경우 반응 4분 이후, Example 3.4.4의 경우 반응 8분 이후, Example 3.4.3의 경우 반응 14분 이후 검출 한도를 넘어서며, 65000의 수치는 데이터 포인트를 채우기 위해 삽입한 것이다.
- [393] 실험 결과, 상기 신규 CRISPR/Cas13 복합체는 1) 적은 농도로도 표적 핵산과 결합하여 부수적 절단 기능이 활성화되며, 2) 표적 핵산 검출 용도로 사용할 수 있을 정도로 충분한 부수적 절단 활성을 보이는 것을 볼 수 있다.

[394]

산업상 이용가능성

- [395] 이 명세서에서 개시하는 발명은 신규 CRISPR/Cas13 시스템과 관련된다. 위 신규 CRISPR/Cas13 시스템은 표적 특이적으로 핵산을 절단할 수 있으며, 부수적으로 임의의 핵산을 절단할 수 있다. 위 신규 CRISPR/Cas13 시스템을 비표적 핵산 절단, 또는 표적 핵산 검출 용도로 사용할 수 있다.

청구범위

- [청구항 1] 다음을 포함하는 신규 CRISPR/Cas13 조성물:
 서열번호 1의 핵산 서열을 포함하는 Cas13 단백질, 또는 위 Cas13 단백질을 암호화하는 핵산; 그리고
 프로그램 가능한 가이드 RNA, 또는 위 프로그램 가능한 가이드 RNA를 암호화하는 핵산,
 위 프로그램 가능한 가이드 RNA는 5'말단에서 3'말단 방향으로 직접 반복부와 가이드 도메인이 연결된 구조를 가지고,
 위 직접 반복부는 위 Cas13 단백질과 상호작용하여 복합체를 형성하고,
 위 직접 반복부는 서열번호 2의 RNA 서열을 포함하고,
 위 가이드 도메인은 미리 결정된 표적 핵산과 상보적으로 결합할 수 있음.
- [청구항 2] 제1항의 신규 CRISPR/Cas13 조성물에 있어서,
 위 Cas13 단백질을 암호화하는 핵산은 DNA 또는 mRNA이고,
 위 프로그램 가능한 가이드 RNA를 암호화하는 핵산은 DNA임.
- [청구항 3] 제1항 내지 제2항 중 어느 하나의 신규 CRISPR/Cas13 조성물에 있어서,
 위 신규 CRISPR/Cas13 조성물은 위 Cas13 단백질과 위 프로그램 가능한 가이드 RNA를 포함하고,
 위 Cas13 단백질과 위 프로그램 가능한 가이드 RNA는 단백질-RNA 복합체를 형성함.
- [청구항 4] 제1항 내지 제2항 중 어느 하나의 신규 CRISPR/Cas13 조성물에 있어서,
 위 신규 CRISPR/Cas13 조성물은 위 Cas13 단백질을 암호화하는 핵산과 위 프로그램 가능한 가이드 RNA를 암호화하는 핵산을 포함함.
- [청구항 5] 제4항의 신규 CRISPR/Cas13 조성물에 있어서,
 위 Cas13 단백질을 암호화하는 핵산과 위 프로그램 가능한 가이드 RNA를 암호화하는 핵산은 한 분자의 벡터에 포함됨.
- [청구항 6] 제4항의 신규 CRISPR/Cas13 조성물에 있어서,
 위 Cas13 단백질을 암호화하는 핵산과 위 프로그램 가능한 가이드 RNA를 암호화하는 핵산은 두 분자 이상의 벡터에 각각 포함됨.
- [청구항 7] 제5항 내지 제6항 중 어느 하나의 신규 CRISPR/cas13 조성물에 있어서,
 상기 벡터는 바이러스 벡터, 비-바이러스 벡터, 또는 이들의 적절한 조합임.
- [청구항 8] 신규 CRISPR/Cas13 시스템을 사용하여 비표적 RNA를 절단하는 방법으로, 다음을 포함함:
 제3항의 신규 CRISPR/Cas13 조성물을 샘플과 혼합하는 과정,
 여기서, 상기 샘플은 표적 RNA 및 비표적 RNA를 포함하고,
 위 신규 CRISPR/Cas13 조성물의 프로그램 가능한 가이드 RNA의 가이드 도메인은 위 표적 RNA와 상보적으로 결합할 수 있음.

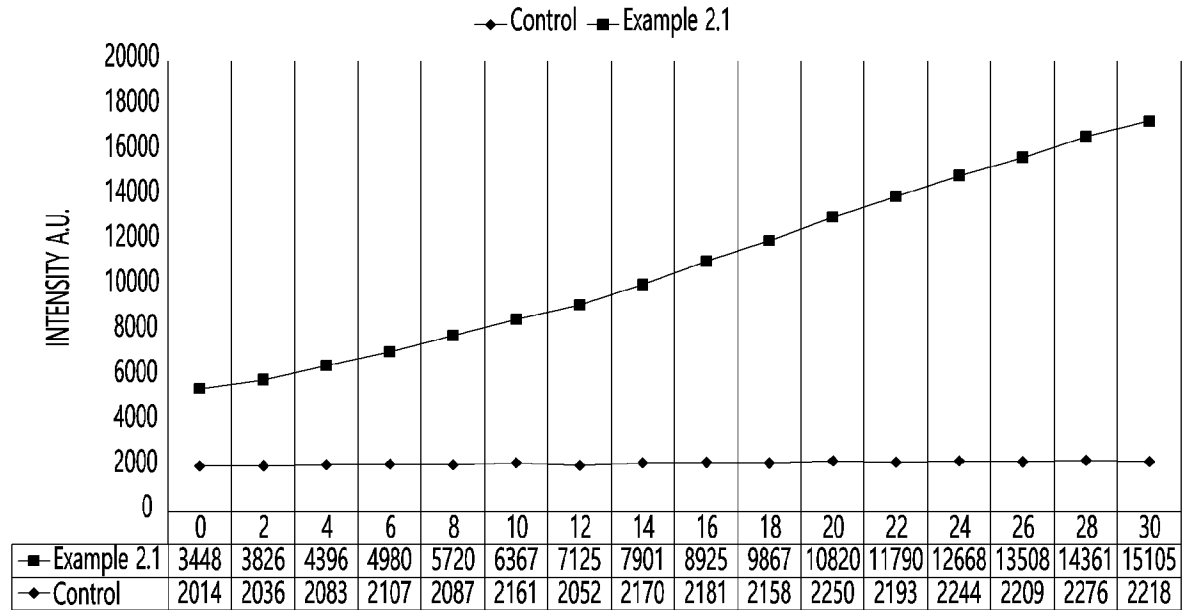
- [청구항 9] 신규 CRISPR/Cas13 시스템을 사용하여 표적 RNA를 검출하는 방법으로, 다음을 포함함:
 (a) 제3항의 신규 CRISPR/Cas13 조성물, 샘플, 그리고 검출 시약을 혼합하는 과정,
 여기서, 위 신규 CRISPR/Cas13 조성물의 프로그램 가능한 가이드 RNA의 가이드 도메인은 위 표적 RNA와 상보적으로 결합할 수 있고,
 위 검출 시약은 리포터를 포함하고, 위 리포터는 프로브 핵산을 포함하고,
 위 프로브 핵산이 절단되면 위 리포터는 검출 가능한 신호를 생성함,
 여기서, 위 샘플이 위 표적 RNA를 포함하는 경우, 위 신규 CRISPR/Cas13 조성물의 단백질-RNA 복합체가 위 표적 RNA와 상보적으로 결합하고, 위 단백질-RNA 복합체의 부수적 절단 기능이 활성화되고, 이에 따라 위 프로브 핵산이 절단됨; 그리고
 (b) 위 혼합물에서 위 검출 가능한 신호를 측정하는 과정,
 위 검출 가능한 신호를 측정하여 위 표적 RNA에 대한 정보를 얻을 수 있음.
- [청구항 10] 제9항의 표적 RNA를 검출하는 방법에 있어서,
 위 (b) 과정은 위 검출 가능한 신호의 발생 여부; 발생하는 신호의 강도; 신호 강도의 시간에 따른 변화; 또는 위 사항의 임의의 조합을 측정하는 과정임.
- [청구항 11] 제9항 내지 제10항 중 어느 하나의 표적 RNA를 검출하는 방법에 있어서,
 위 표적 RNA에 대한 정보는 위 표적 RNA가 존재하는 지 여부, 위 표적 RNA가 샘플 내에 얼마나 포함되었는 지 여부, 또는 위 사항 모두임.
- [청구항 12] 제9항 내지 제11항 중 어느 하나의 표적 RNA를 검출하는 방법에 있어서,
 위 검출 가능한 신호는 형광 신호임.
- [청구항 13] 다음을 포함하는, COVID-19 진단 정보 제공 방법:
 (a) 신규 CRISPR/Cas13 복합체, 검체, 그리고 검출 시약을 혼합하는 과정,
 여기서, 위 검체는 COVID-19 감염이 의심되는 환자에서 채취한 검체이고,
 여기서, 위 신규 CRISPR/Cas13 복합체는 다음을 포함함:
 서열번호 1의 Cas13 단백질; 그리고 가이드 RNA,
 여기서, 위 가이드 RNA는 5'말단에서 3'말단 방향으로 서열번호 2의 직접 반복부와 가이드 도메인이 순차적으로 연결된 구조이고,
 위 가이드 도메인은 서열번호 37 내지 서열번호 51, 그리고 서열번호 52 내지 서열번호 56 중 선택된 RNA 서열을 포함함,
 여기서, 위 검출 시약은 리포터를 포함하고, 위 리포터는 프로브 핵산을 포함하고,
 위 프로브 핵산이 절단되면 위 리포터는 형광 신호를 생성함;
 (b) 위 혼합물에서 형광 신호를 측정하는 과정; 그리고,

(c) 위 형광 신호를 분석하여 검체를 제공한 환자가 COVID-19에 감염되었는지에 대한 정보를 얻는 과정.

[청구항 14] 제13항의 COVID-19 진단 정보 제공 방법에 있어서,
위 (b) 과정은 형광 신호 발생 여부; 발생하는 형광 신호의 강도; 형광 신호의 시간에 따른 변화; 또는 이들의 임의의 조합을 측정하는 과정임.

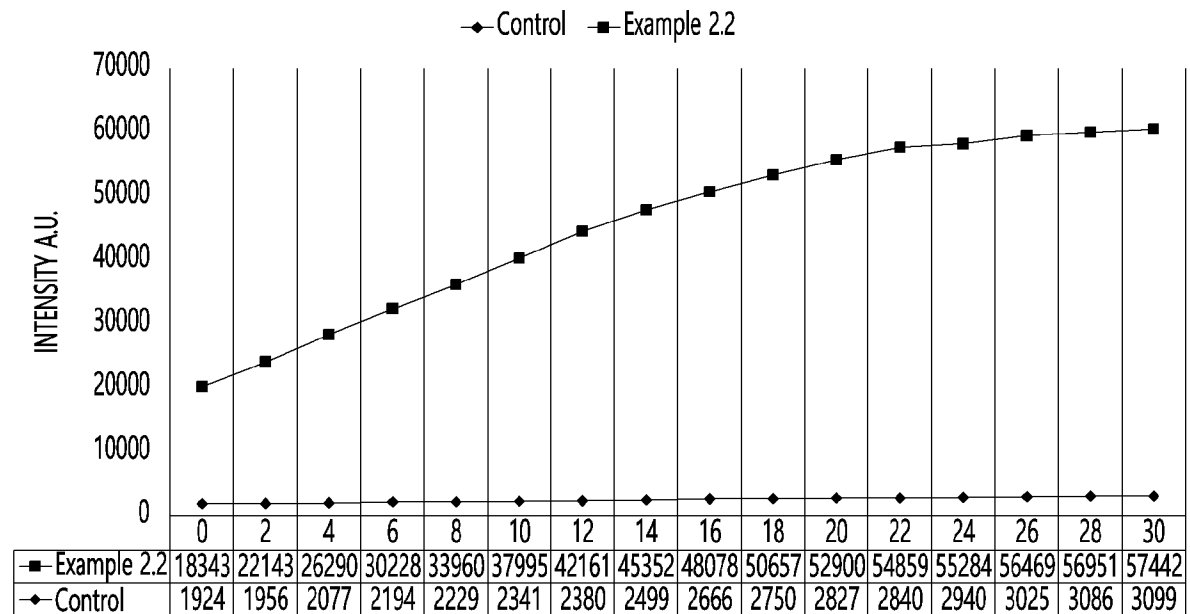
[도1]

시간에 따른 형광 신호 강도, EXAMPLE 2.1



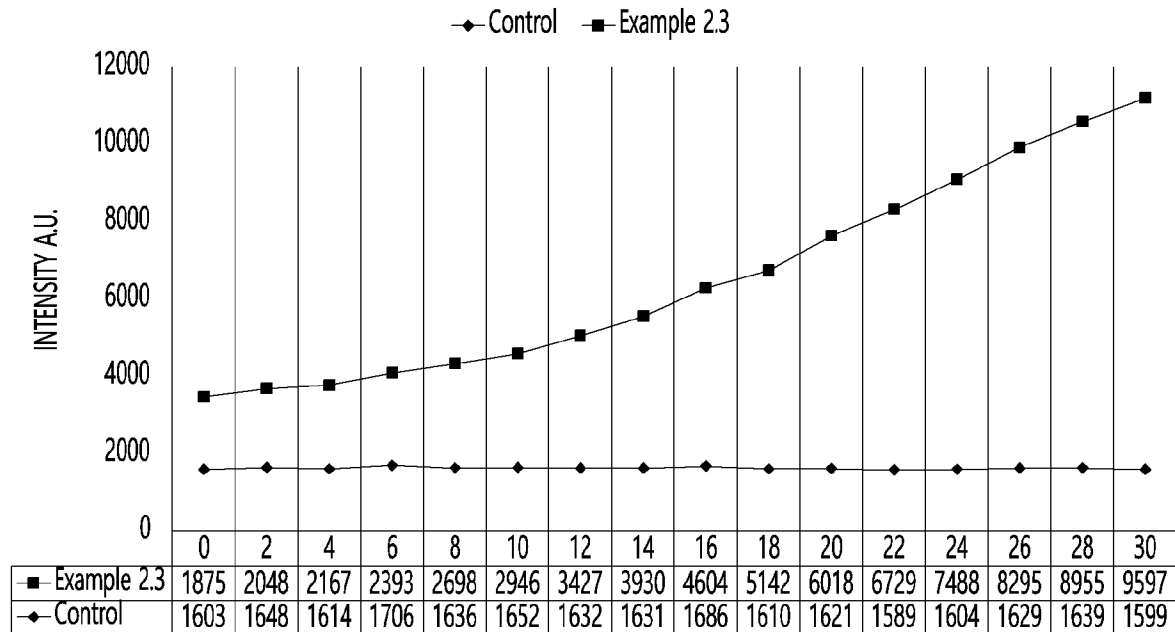
[도2]

시간에 따른 형광 신호 강도, EXAMPLE 2.2



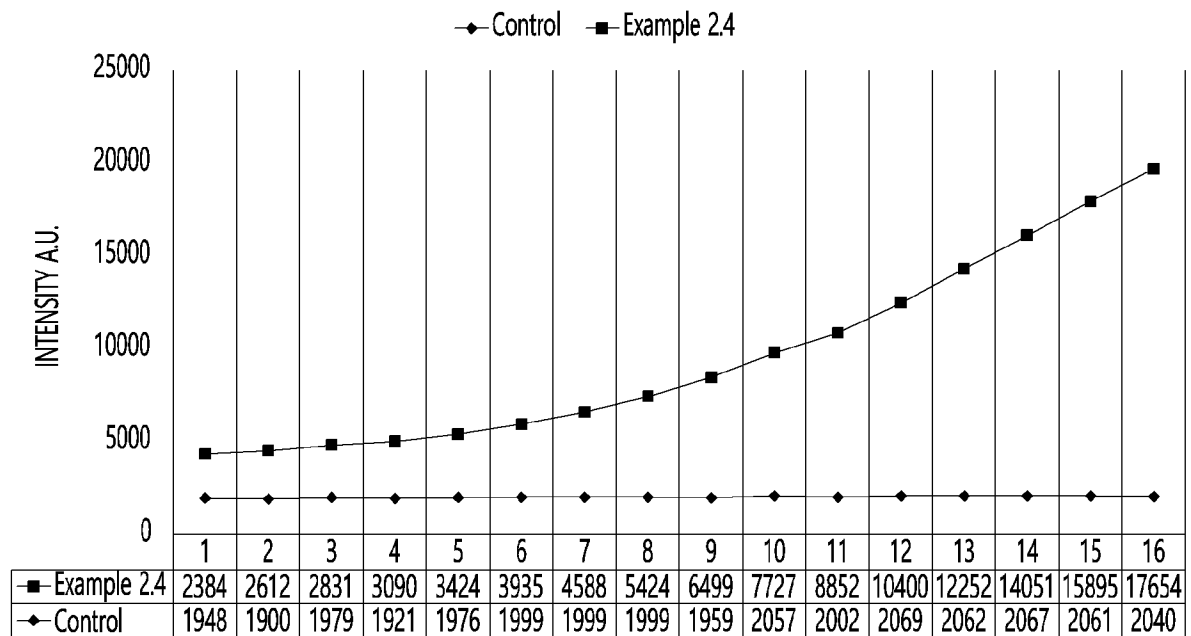
[도3]

시간에 따른 형광 신호 강도, EXAMPLE 2.2



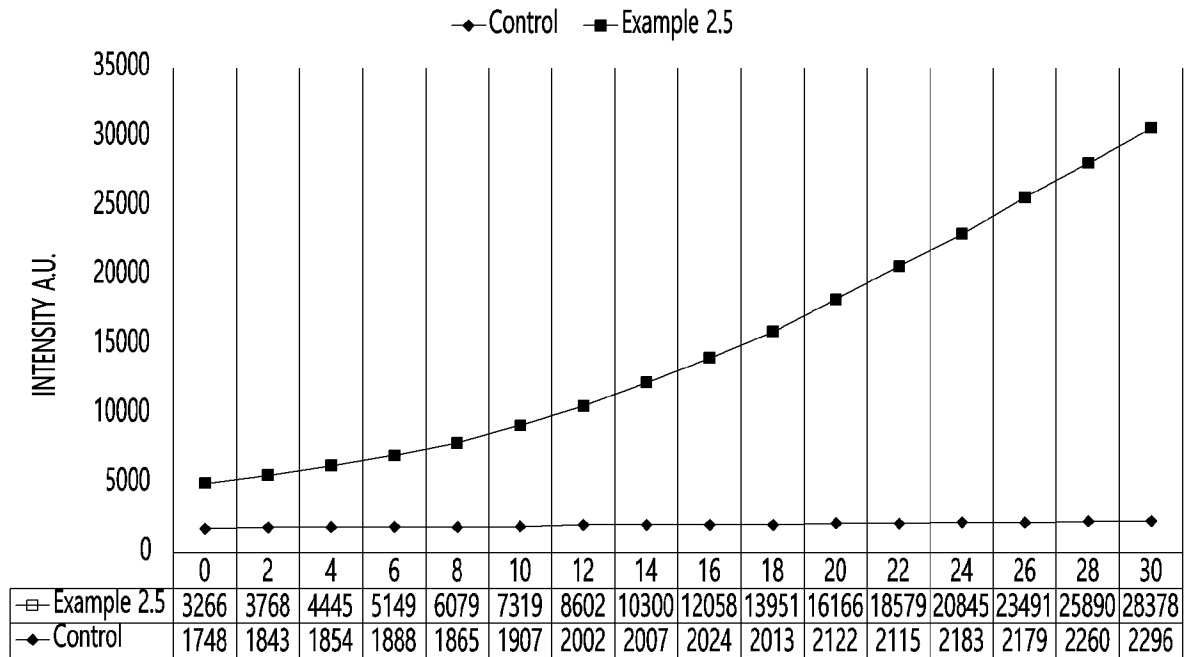
[도4]

시간에 따른 형광 신호 강도, EXAMPLE 2.4



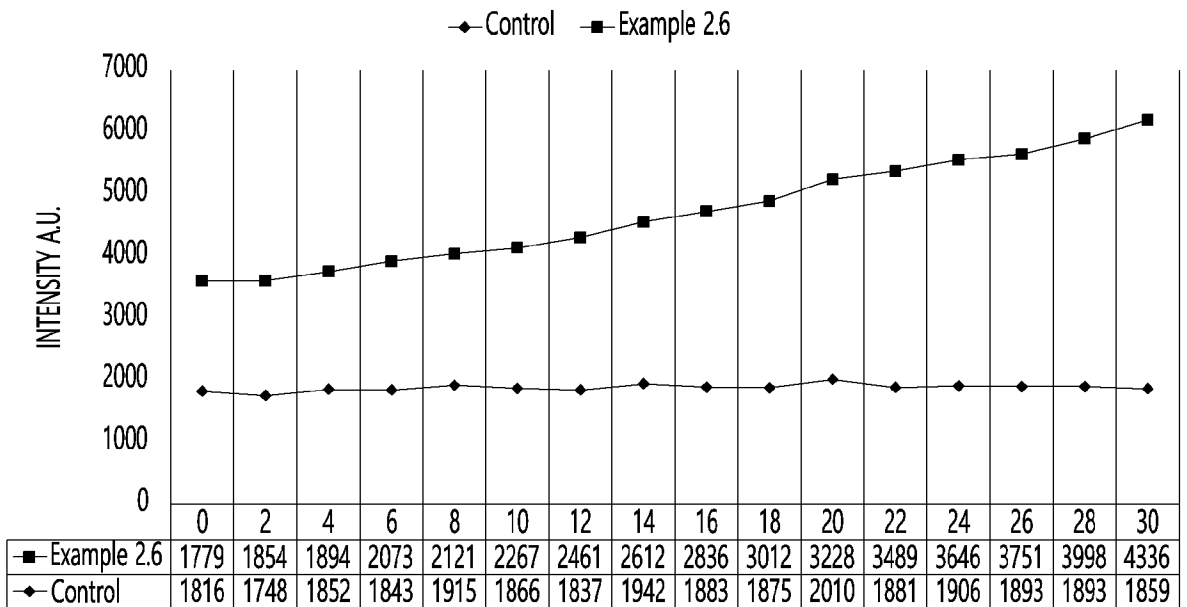
[도5]

시간에 따른 형광 신호 강도, EXAMPLE 2.5



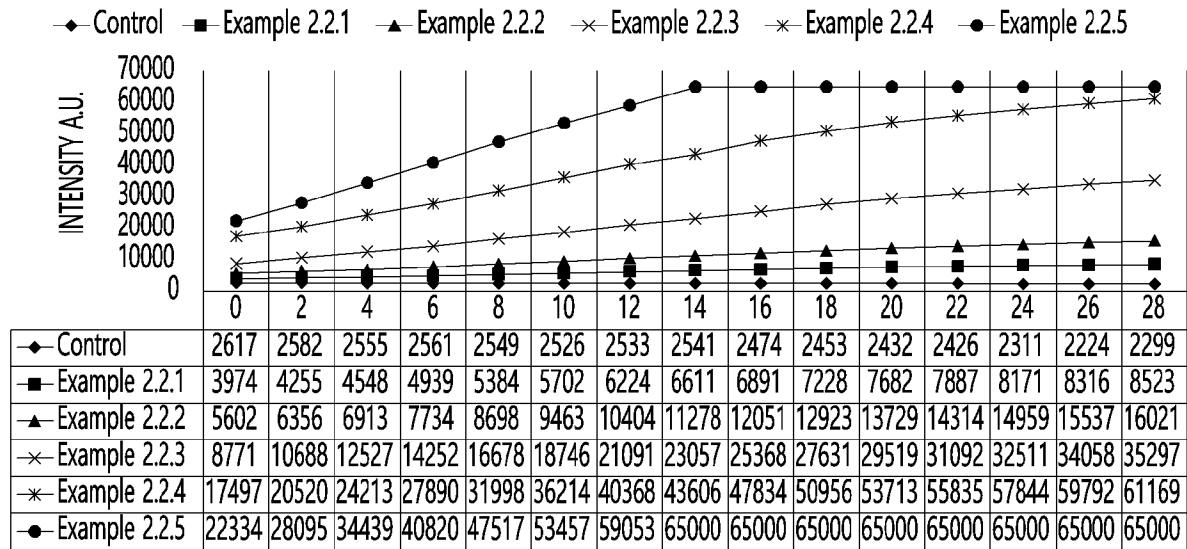
[도6]

시간에 따른 형광 신호 강도, EXAMPLE 2.6



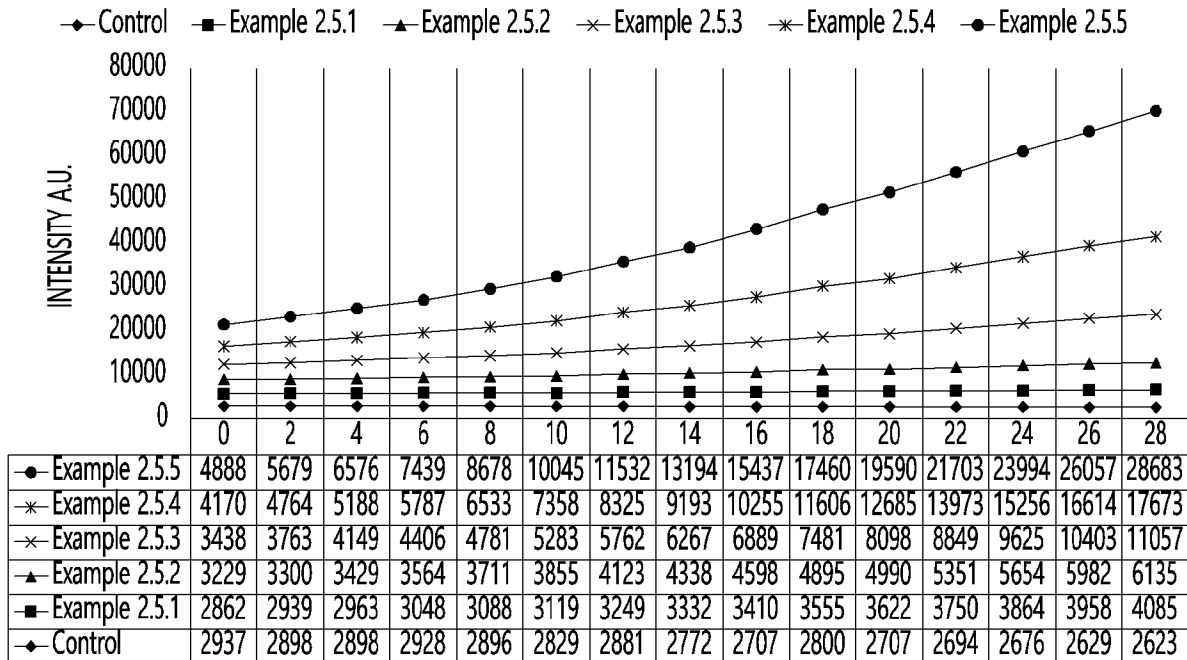
[도7]

농도 별 형광 신호 강도

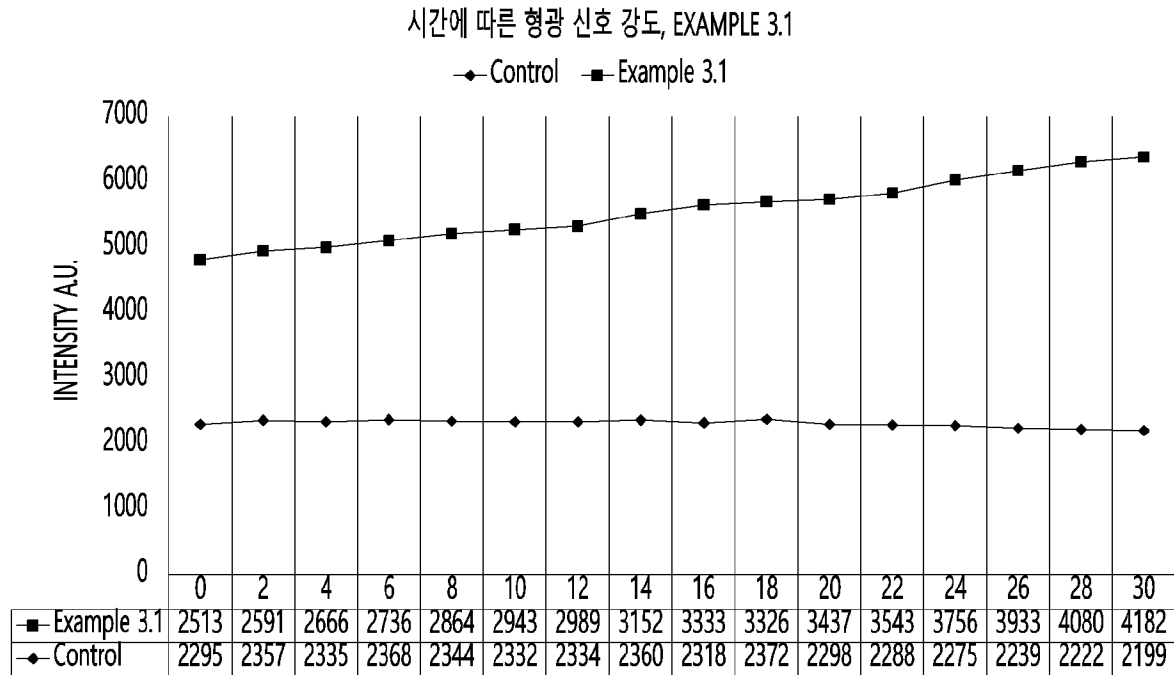


[도8]

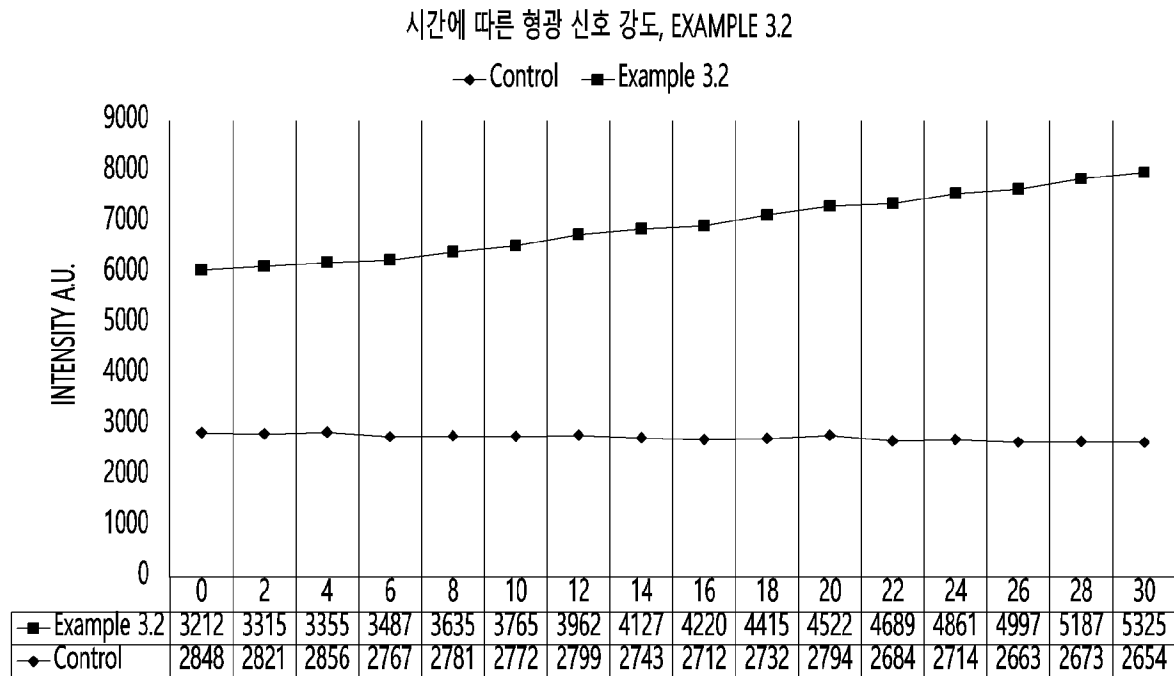
농도 별 형광 신호 강도



[도9]

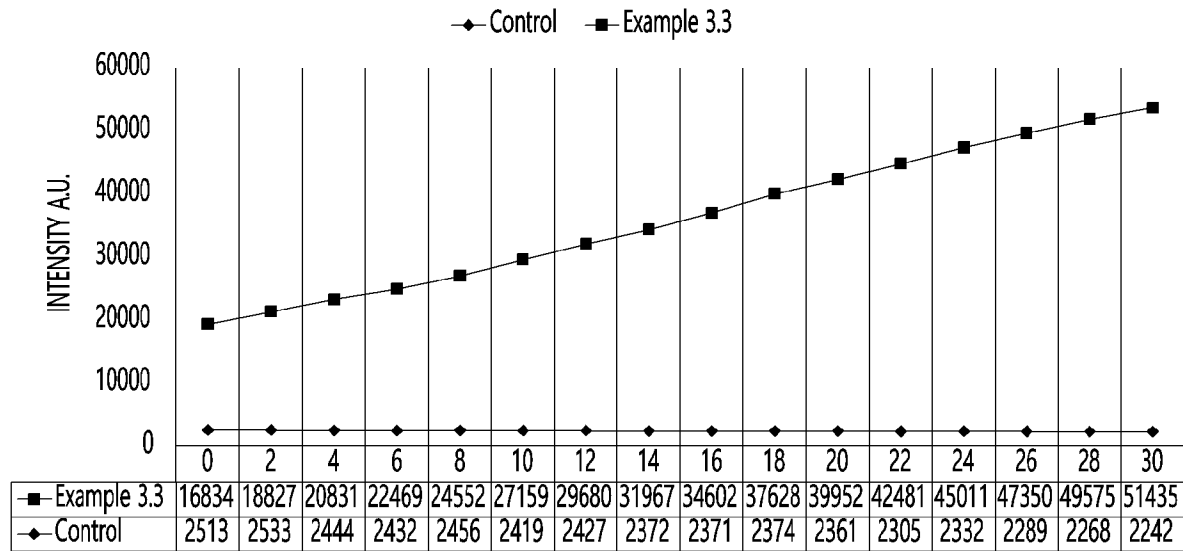


[도10]



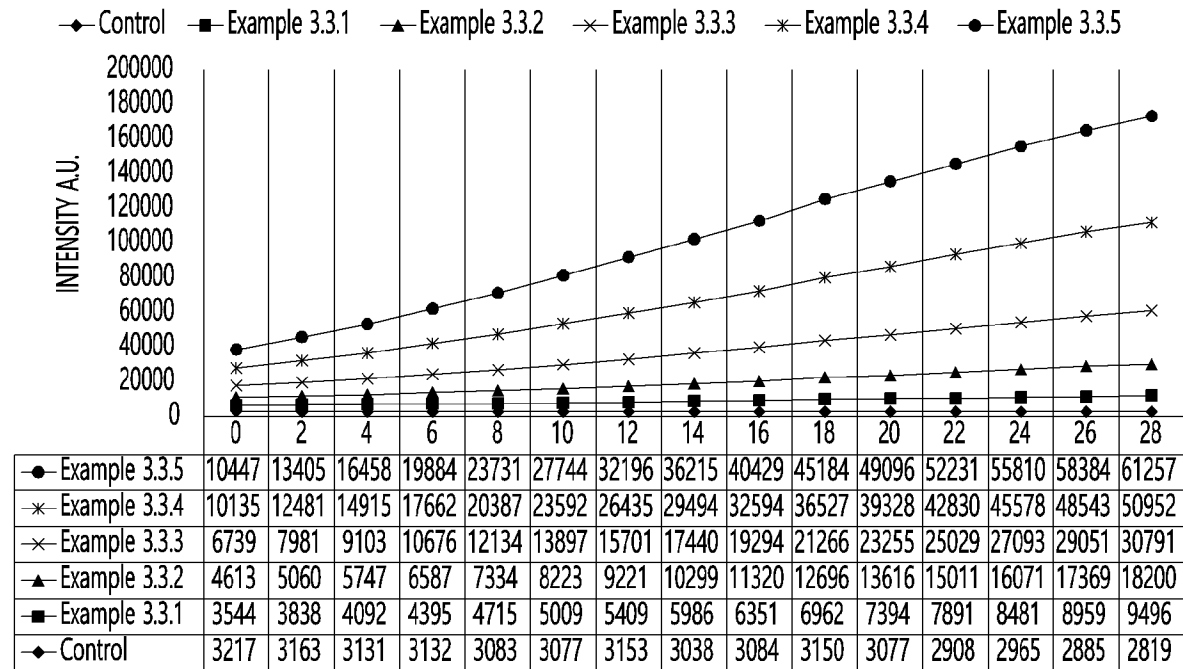
[도11]

시간에 따른 형광 신호 강도, EXAMPLE 3.3



[도12]

농도 별 형광 신호



농도 별 형광 신호

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/KR2024/095888

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

C12N 15/10(2006.01)i; C12N 9/22(2006.01)i; C12N 15/113(2010.01)i; C12Q 1/6897(2018.01)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 15/10(2006.01); A61K 38/46(2006.01); A61K 47/54(2017.01); A61K 9/51(2006.01); C12N 15/113(2010.01);
C12N 9/22(2006.01); C12Q 1/6818(2018.01); C12Q 1/70(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/Cas13, CRISPR/Cas13d, 가이드 RNA (guide RNA), 프로토스페이스 측면 서열 (protospacer flanking sequence; PFS), 부수적 절단 활성 (collateral cleavage activity)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	US 2019-0062724 A1 (SALK INSTITUTE FOR BIOLOGICAL STUDIES) 28 February 2019 (2019-02-28) See paragraph [0271]; and SEQ ID NO: 249.	1-14
A	CN 114774389 A (TIANJIN HOSPITAL) 22 July 2022 (2022-07-22) See claims 1-10.	1-14
A	KR 10-2022-0160510 A (KOREA ADVANCED INSTITUTE OF SCIENCE AND TECHNOLOGY) 06 December 2022 (2022-12-06) See claims 1-11.	1-14
A	US 2022-0347115 A1 (DUKE UNIVERSITY et al.) 03 November 2022 (2022-11-03) See claims 1, 23, 24 and 29.	1-14
A	CN 115820934 A (INSTITUTE OF PRECISION MEASUREMENT SCIENCE AND TECHNOLOGY INNOVATION, CHINESE ACADEMY OF SCIENCES) 21 March 2023 (2023-03-21) See claims 1 and 2.	1-14



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

07 October 2024

Date of mailing of the international search report

07 October 2024

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/KR2024/095888

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.
 - b. ☐ furnished subsequent to the international filing date for the purposes of international search (Rule 13ter.1(a)),
☐ accompanied by a statement to the effect that the sequence listing does not go beyond the disclosure in the international application as filed.
2. ☐ With regard to any nucleotide and/or amino acid sequence disclosed in the international application, this report has been established to the extent that a meaningful search could be carried out without a WIPO Standard ST.26 compliant sequence listing.
3. Additional comments:

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.

PCT/KR2024/095888

Patent document cited in search report			Publication date (day/month/year)	Patent family member(s)			Publication date (day/month/year)
US	2019-0062724	A1	28 February 2019	AU	2018-320870	A1	27 February 2020
				AU	2018-320870	A1	28 February 2019
				CA	3072610	A1	28 February 2019
				CN	111328343	A	23 June 2020
				CN	111328343	B	28 November 2023
				EP	3673055	A1	01 July 2020
				JP	2020-532968	A	19 November 2020
				JP	2023-153907	A	18 October 2023
				SG	11-2020-01208	A	30 March 2020
				US	10476825	B2	12 November 2019
				US	10666592	B2	26 May 2020
				US	10931613	B2	23 February 2021
				US	11005799	B2	11 May 2021
				US	11025574	B2	01 June 2021
				US	11032224	B2	08 June 2021
				US	11032225	B2	08 June 2021
				US	11228547	B2	18 January 2022
				US	11303592	B2	12 April 2022
				US	11303593	B2	12 April 2022
				US	11303594	B2	12 April 2022
				US	11310179	B2	19 April 2022
				US	11310180	B2	19 April 2022
				US	11316812	B2	26 April 2022
				US	11706177	B2	18 July 2023
				US	2019-169595	A1	06 June 2019
				US	2019-207890	A1	04 July 2019
				US	2020-127954	A9	23 April 2020
				US	2020-199556	A1	25 June 2020
				US	2020-244609	A1	30 July 2020
				US	2020-252359	A1	06 August 2020
				US	2020-322297	A1	08 October 2020
				US	2020-351231	A1	05 November 2020
				US	2020-351232	A1	05 November 2020
				US	2021-344626	A1	04 November 2021
				US	2021-344627	A1	04 November 2021
				US	2021-344628	A1	04 November 2021
				US	2021-344629	A1	04 November 2021
				US	2021-344630	A1	04 November 2021
				US	2021-344631	A1	04 November 2021
				US	2022-239615	A1	28 July 2022
				US	2023-328020	A1	12 October 2023
				WO	2019-040664	A1	28 February 2019
CN	114774389	A	22 July 2022	CN	114774389	B	29 September 2023
KR	10-2022-0160510	A	06 December 2022	WO	2022-250503	A1	01 December 2022
US	2022-0347115	A1	03 November 2022	EP	3999117	A1	25 May 2022
				EP	3999117	A4	26 July 2023
				WO	2021-011504	A1	21 January 2021
CN	115820934	A	21 March 2023	None			

A. 발명이 속하는 기술분류(국제특허분류(IPC)) C12N 15/10(2006.01)i; C12N 9/22(2006.01)i; C12N 15/113(2010.01)i; C12Q 1/6897(2018.01)i		
B. 조사된 분야 조사된 최소문헌(국제특허분류를 기재) C12N 15/10(2006.01); A61K 38/46(2006.01); A61K 47/54(2017.01); A61K 9/51(2006.01); C12N 15/113(2010.01); C12N 9/22(2006.01); C12Q 1/6818(2018.01); C12Q 1/70(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/Cas13, CRISPR/Cas13d, 가이드 RNA (guide RNA), 프로토스페이서 측면 서열 (protospacer flanking sequence; PFS), 부수적 절단 활성 (collateral cleavage activity)		
C. 관련 문헌		
카테고리*	인용문헌명 및 관련 구절(해당하는 경우)의 기재	관련 청구항
A	US 2019-0062724 A1 (SALK INSTITUTE FOR BIOLOGICAL STUDIES) 2019.02.28 단락 [0271]; 서열번호 249	1-14
A	CN 114774389 A (TIANJIN HOSPITAL) 2022.07.22 청구항 1-10	1-14
A	KR 10-2022-0160510 A (한국과학기술원) 2022.12.06 청구항 1-11	1-14
A	US 2022-0347115 A1 (DUKE UNIVERSITY 등) 2022.11.03 청구항 1, 23, 24, 29	1-14
A	CN 115820934 A (INSTITUTE OF PRECISION MEASUREMENT SCIENCE AND TECHNOLOGY INNOVATION, CHINESE ACADEMY OF SCIENCES) 2023.03.21 청구항 1, 2	1-14
☐ 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 “T” 국제출원일 또는 우선일 후에 공개된 문헌으로, 출원과 상충하지 않으며 발명의 기초가 되는 원리나 이론을 이해하기 위해 인용된 문헌 “X” 특별한 관련이 있는 문헌. 해당 문헌 하나만으로 청구된 발명의 신규성 또는 진보성이 없는 것으로 본다. “Y” 특별한 관련이 있는 문헌. 해당 문헌이 하나 이상의 다른 문헌과 조합하는 경우로 그 조합이 당업자에게 자명한 경우 청구된 발명은 진보성이 없는 것으로 본다. “&” 동일한 대응특허문헌에 속하는 문헌		
국제조사의 실제 완료일 2024년10월07일(07.10.2024)		국제조사보고서 발송일 2024년10월07일(07.10.2024)
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

제1기제란 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. ☒ 출원시 국제출원의 일부를 구성하는 서열목록
 - b. ☐ 국제조사를 목적으로 국제출원일 이후에 제출된 서열목록(규칙 13의3.1(a))

☐ 서열목록이 출원시 국제출원의 개시 범위를 넘지 않는다는 취지의 진술서를 첨부
2. ☐ 국제출원에 개시된 핵산염기 및/또는 아미노산 서열에 대해, 본 보고서는 WIPO 표준 ST.26을 준수하는 서열목록이 없이 유효한 조사를 할 수 있는 범위에서 작성되었습니다
3. 추가 의견:

국제조사보고서에서 인용된 특허문헌	공개일	대응특허문헌	공개일
US 2019-0062724 A1	2019/02/28	AU 2018-320870 A1	2020/02/27
		AU 2018-320870 A1	2019/02/28
		CA 3072610 A1	2019/02/28
		CN 111328343 A	2020/06/23
		CN 111328343 B	2023/11/28
		EP 3673055 A1	2020/07/01
		JP 2020-532968 A	2020/11/19
		JP 2023-153907 A	2023/10/18
		SG 11-2020-01208 A	2020/03/30
		US 10476825 B2	2019/11/12
		US 10666592 B2	2020/05/26
		US 10931613 B2	2021/02/23
		US 11005799 B2	2021/05/11
		US 11025574 B2	2021/06/01
		US 11032224 B2	2021/06/08
		US 11032225 B2	2021/06/08
		US 11228547 B2	2022/01/18
		US 11303592 B2	2022/04/12
		US 11303593 B2	2022/04/12
		US 11303594 B2	2022/04/12
		US 11310179 B2	2022/04/19
		US 11310180 B2	2022/04/19
		US 11316812 B2	2022/04/26
		US 11706177 B2	2023/07/18
		US 2019-169595 A1	2019/06/06
		US 2019-207890 A1	2019/07/04
		US 2020-127954 A9	2020/04/23
		US 2020-199556 A1	2020/06/25
		US 2020-244609 A1	2020/07/30
		US 2020-252359 A1	2020/08/06
		US 2020-322297 A1	2020/10/08
		US 2020-351231 A1	2020/11/05
		US 2020-351232 A1	2020/11/05
		US 2021-344626 A1	2021/11/04
		US 2021-344627 A1	2021/11/04
		US 2021-344628 A1	2021/11/04
		US 2021-344629 A1	2021/11/04
		US 2021-344630 A1	2021/11/04
		US 2021-344631 A1	2021/11/04
		US 2022-239615 A1	2022/07/28
		US 2023-328020 A1	2023/10/12
		WO 2019-040664 A1	2019/02/28
CN 114774389 A	2022/07/22	CN 114774389 B	2023/09/29
KR 10-2022-0160510 A	2022/12/06	WO 2022-250503 A1	2022/12/01
US 2022-0347115 A1	2022/11/03	EP 3999117 A1	2022/05/25
		EP 3999117 A4	2023/07/26
		WO 2021-011504 A1	2021/01/21
CN 115820934 A	2023/03/21	없음	