

(12) 특허협력조약에 의하여 공개된 국제출원

(19) 세계지식재산권기구
국제사무국

(43) 국제공개일
2013년 7월 4일 (04.07.2013)



(10) 국제공개번호
WO 2013/100713 A3

- (51) 국제특허분류:
C12N 15/81 (2006.01) *C12N 15/65* (2006.01)
C12N 1/19 (2006.01)
- (21) 국제출원번호: PCT/KR2012/011772
- (22) 국제출원일: 2012년 12월 28일 (28.12.2012)
- (25) 출원언어: 한국어
- (26) 공개언어: 한국어
- (30) 우선권정보:
10-2011-0146746 2011년 12월 30일 (30.12.2011) KR
10-2011-0146752 2011년 12월 30일 (30.12.2011) KR
- (71) 출원인: 이화여자대학교 산학협력단 (EWAH UNIVERSITY-INDUSTRY COLLABORATION FOUNDATION) [KR/KR]; 120-750 서울시 서대문구 이화여대길 26 이화여자대학교, Seoul (KR).
- (72) 발명자: 최원자 (CHOI, Won Ja); 120-170 서울시 서대문구 이화여대길 26 이화여자대학교 자연과학대학 생명과학과, Seoul (KR). 김완기 (KIM, Wan Kee); 443-380 경기도 수원시 영통구 원천동 산 5번지 아주대학교 의과대학 의과학연구소 분자생물학실, Gyeonggi-do (KR).
- (74) 대리인: 양부현 (YANG, Boo-Hyun); 151-832 서울시 관악구 인현동 1659-2 청동빌딩 301호, 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, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KM, KN, KP, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW.
- (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, 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, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

공개:

— 국제조사보고서와 함께 (조약 제 21 조(3))

(88) 국제조사보고서 공개일: 2013년 9월 19일

(54) Title: YEAST EXPRESSION VECTOR FOR YEAST CHROMOSOMAL INTEGRATION OR TRANSFORMATION OF INDUSTRIAL STRAINS, AND USE THEREOF

(54) 발명의 명칭: 효모 염색체 통합 또는 산업 스트레인 형질전환용 효모 발현 벡터, 그리고 이들의 용도

(57) Abstract: The present invention relates to a novel dual module expression vector for yeast transformation, and a transformation method of a target nucleotide sequence using the same. An expression module of the present invention comprises: an expression module comprising a multiple cloning site (MCS), a proper promoter, and a terminator; and a rescue module. The vector of the present invention can stably express a target gene in a yeast, particularly, *Kluyveromyces marxianus* or *Saccharomyces cerevisiae*, and can integrate a target gene to a specific position in a chromosome with high efficiency. A transformation method using the vector of the present invention can be very usefully applied to industrial production of desired products (biomass) since it is possible to prepare a transgenic yeast strain in which a target gene is stably integrated in a chromosome, and then to carry out continuous transformation for inducing the modification of another target gene to the yeast strain.

(57) 요약서: 본 발명은 효모 형질전환용 신규한 이중 모듈 발현 벡터(dual module expression vector) 및 이를 이용한 목적 뉴클레오타이드 서열의 형질전환 방법에 관한 것이다. 본 발명의 발현 모듈은 멀티 클로닝 위치(multiple cloning site, MCS), 적합한 프로모터 및 터미네이터(terminator)를 포함하는 발현 모듈(expression module) 및 레스큐 모듈(rescue module)을 포함한다. 본 발명의 벡터는 효모, 구체적으로는 클루이베로미세스 막시아누스(*Kluyveromyces marxianus*) 또는 사카로마이세스 세레비시애(*Saccharomyces cerevisiae*)에서 목적 유전자를 안정적으로 발현시킬 수 있을 뿐 아니라, 염색체 내 특정 위치로 목적 유전자를 고효율로 통합시킬 수 있다. 본 발명의 벡터를 이용한 형질전환 방법은 안정적으로 목적 유전자를 안정적으로 염색체로 통합시킨 형질전환 효모 스트레인을 제작한 후 상기 효모 스트레인에 또 다른 목적 유전자의 변형을 유발시키는 연속적인 형질전환이 가능함에 따라, 소망하는 산물들(바이오매스)의 산업적 생산에 매우 유용하게 적용될 수 있다.

WO 2013/100713 A3

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/KR2012/011772**A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER*****C12N 15/81(2006.01)i, C12N 1/19(2006.01)i, C12N 15/65(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 15/81; C12N 5/10; A61K 31/7088; C12N 1/19; C12N 15/65

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: autonomously replicating sequence, KmPCLP3, MCS, PCLPpro, PCLPter, expression module, selection marker, loxP, rescue module, yeast, expression vector, ARS2, kanMX, Cre recombinase

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	Fang Fang et al. Yeast. Published online 08 October 2010, vol. 28, no. 2, pages 123-136. A vector set for systematic metabolic engineering in <i>Saccharomyces cerevisiae</i> See abstract, materials and methods etc.	1-7
Y	BALL, Maria M. et al. J. Mol. Microbiol. Biotechnol. 1999, vol. 1, no. 2, pages 347-353. Construction of efficient centromeric, multicopy and expression vectors for the yeast <i>Kluyveromyces marxianus</i> using homologous elements and the promoter of a purine-cytosine-like permease See abstract, pages 347-349 etc.	1-7
A	WIDER, Diana et al. Molecular and Biochemical Parasitology. 2009, vol. 164, no. 2, pages 147-152. The complementation of yeast with human or <i>Plasmodium falciparum</i> Hsp90 confers differential inhibitor sensitivities See the entire document	1-7
A	US 2008-0004228 A1 (BERGER, Imre et al.) 03 January 2008 See the entire document	1-7



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

"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

28 JUNE 2013 (28.06.2013)

Date of mailing of the international search report

01 JULY 2013 (01.07.2013)

Name and mailing address of the ISA/KR

Korean Intellectual Property Office
Government Complex-Daejeon, 189 Seonsa-ro, Daejeon 302-701,
Republic of Korea

Facsimile No. 82-42-472-7140

Authorized officer

Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/KR2012/011772

Box No. II Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 2 of first sheet)

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. ☐ Claims Nos.:
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:

2. ☐ Claims Nos.:
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:

3. ☐ Claims Nos.:
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

Box No. III Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 3 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

See extra sheet.

1. ☐ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2. ☐ As all searchable claims could be searched without effort justifying additional fees, this Authority did not invite payment of additional fees.
3. ☐ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:

4. ☒ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

1-7

Remark on Protest

- ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest and, where applicable, the payment of a protest fee.
- ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest but the applicable protest fee was not paid within the time limit specified in the invitation.
- ☐ No protest accompanied the payment of additional search fees.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.

PCT/KR2012/011772

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member	Publication date
US 2008-0004228 A1	03.01.2008	AT 442450 T	15.09.2009
		AU 2004-316874 A1	15.09.2005
		AU 2004-316874 B2	06.01.2011
		CA 2558313 A1	15.09.2005
		CA 2558313 C	17.05.2011
		DE 602004023128 D1	22.10.2009
		EP 1723246 A1	22.11.2006
		EP 1723246 B1	09.09.2009
		EP 2133428 A1	16.12.2009
		ES 2333228 T3	18.02.2010
		JP 04-597188 B2	15.12.2010
		JP 04-597188 B2	01.10.2010
		JP 2007-527722 A	04.10.2007
		JP 2007-527722 T	04.10.2007
		WO 2005-085456 A1	15.09.2005

Continuation of: Box No. III

The International Search Authority found multiple groups of inventions in the present application, as follows:

Group 1: claims 1-7

Group 2: claims 8-14 and 25-27(a part of claims)

Group 3: claims 15-24 and 25-27(a part of claims)

Compared with the inventions of groups 1-3, the same or corresponding special technical feature pertains to "an yeast expression vector comprising: an expression module containing a promoter, a multi-cloning position, and a terminator; a selective marker; and a rescue module containing an loxP sequence bound to both ends of the selective marker," but the special technical feature is disclosed in the following cited documents published before this application was filed, and thus it is not considered that the special technical feature among the inventions is novel or involves an inventive step.

Document D1: Fang Fang et al. Yeast. Published online, 08 October 2010, vol. 28, no. 2, pp. 123-136.

A vector set for systematic metabolic engineering in *Saccharomyces cerevisiae*

Document D1: Diana Wider et al., Molecular and Biochemical Parasitology. 2009, vol. 164, no. 2, pp. 147-152. The complementation of yeast with human or *Plasmodium falciparum* Hsp90 Confers differential inhibitor sensitivities

Therefore, since it is not considered that the inventions of the 3 groups include the the same or corresponding special technical feature that have been improved over the prior art, this application does not meet the requirements of unity of invention under PCT Rules 13.1 and 13.2.

A. 발명이 속하는 기술분류(국제특허분류(IPC)) C12N 15/81(2006.01)i, C12N 1/19(2006.01)i, C12N 15/65(2006.01)i		
B. 조사된 분야 조사된 최소문헌(국제특허분류를 기재) C12N 15/81; C12N 5/10; A61K 31/7088; C12N 1/19; C12N 15/65 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: 자가복제 서열, KmPCLP3, MCS, PCLPpro, PCLPter, 발현 모듈, 선택 마커, loxP, 레스큐 모듈, 효모, 발현백터, ARS2, kanMX, Cre 리컴비나제		
C. 관련 문헌		
카테고리*	인용문헌명 및 관련 구절(해당하는 경우)의 기재	관련 청구항
Y	Fang Fang 등. Yeast. Published online 2010.10.08, Vol. 28, No. 2, 페이지 123-136. A vector set for systematic metabolic engineering in Saccharomyces cerevisiae abstract, Materials and methods 등 참조	1-7
Y	MARIA M. BALL 등. J. Mol. Microbiol. Biotechnol. 1999, Vol. 1, No. 2, 페이지 347-353. Construction of Efficient Centromeric, Multicopy and Expression Vectors for the Yeast Kluyveromyces marxianus Using Homologous Elements and the Promoter of a Purine-Cytosine-Like Permease abstract, 페이지 347-349 등 참조	1-7
A	Diana Wider 등. Molecular and Biochemical Parasitology. 2009, Vol. 164, No. 2, 페이지 147-152. The complementation of yeast with human or Plasmodium falciparum Hsp90 confers differential inhibitor sensitivities 전체 문헌 참조	1-7
A	US 2008-0004228 A1 (IMRE BERGER 등) 2008.01.03 전체 문헌 참조	1-7
☐ 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 “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 2013년 06월 28일 (28.06.2013)		국제조사보고서 발송일 2013년 07월 01일 (01.07.2013)
ISA/KR의 명칭 및 우편주소  대한민국 특허청 (302-701) 대전광역시 서구 청사로 189, 4동 (둔산동, 정부대전청사) 팩스 번호 82-42-472-7140		심사관 최준호 전화번호 82-42-481-5569 

제2기재란 일부 청구항을 조사할 수 없는 경우의 의견(첫 번째 용지의 2의 계속)

PCT 제17조(2)(a)의 규정에 따라 다음과 같은 이유로 일부 청구항에 대하여 본 국제조사보고서가 작성되지 아니하였습니다.

1. ☐ 청구항:
이 청구항은 본 기관이 조사할 필요가 없는 대상에 관련됩니다. 즉,
2. ☐ 청구항:
이 청구항은 유효한 국제조사를 수행할 수 없을 정도로 소정의 요건을 충족하지 아니하는 국제출원의 부분과 관련됩니다. 구체적으로는,
3. ☐ 청구항:
이 청구항은 종속청구항이나 PCT규칙 6.4(a)의 두 번째 및 세 번째 문장의 규정에 따라 작성되어 있지 않습니다.

제3기재란 발명의 단일성이 결여된 경우의 의견(첫 번째 용지의 3의 계속)

본 국제조사기관은 본 국제출원에 다음과 같이 다수의 발명이 있다고 봅니다.

추가 용지 참조

1. ☐ 출원인이 모든 추가수수료를 기간 내에 납부하였으므로, 본 국제조사보고서는 모든 조사 가능한 청구항을 대상으로 합니다.
2. ☐ 추가수수료 납부를 요구하지 않고도 모든 조사 가능한 청구항을 조사할 수 있었으므로, 본 기관은 추가수수료 납부를 요구하지 아니하였습니다.
3. ☐ 출원인이 추가수수료의 일부만을 기간 내에 납부하였으므로, 본 국제조사보고서는 수수료가 납부된 청구항만을 대상으로 합니다. 구체적인 청구항은 아래와 같습니다.
4. ☒ 출원인이 기간 내에 추가수수료를 납부하지 아니하였습니다. 따라서 본 국제조사보고서는 청구범위에 처음 기재된 발명에 한정되어 있으며, 해당 청구항은 아래와 같습니다.

1-7

이의신청에
관한 기재

- ☐ 출원인의 이의신청 및 이의신청료 납부(해당하는 경우)와 함께 추가수수료가 납부되었습니다.
- ☐ 출원인의 이의신청과 함께 추가수수료가 납부되었으나 이의신청료가 보정요구서에 명시된 기간 내에 납부되지 아니하였습니다.
- ☐ 이의신청 없이 추가수수료가 납부되었습니다.

국제조사보고서에서 인용된 특허문헌	공개일	대응특허문헌	공개일
US 2008-0004228 A1	2008.01.03	AT 442450 T	2009.09.15
		AU 2004-316874 A1	2005.09.15
		AU 2004-316874 B2	2011.01.06
		CA 2558313 A1	2005.09.15
		CA 2558313 C	2011.05.17
		DE 602004023128 D1	2009.10.22
		EP 1723246 A1	2006.11.22
		EP 1723246 B1	2009.09.09
		EP 2133428 A1	2009.12.16
		ES 2333228 T3	2010.02.18
		JP 04-597188 B2	2010.12.15
		JP 04-597188 B2	2010.10.01
		JP 2007-527722 A	2007.10.04
		JP 2007-527722 T	2007.10.04
		WO 2005-085456 A1	2005.09.15

(제3기재란의 연속)

본 국제조사기관은 본 국제출원에 다음과 같이 다수의 발명이 있다고 봅니다.

제1군: 청구항 제1-7항

제2군: 청구항 제8-14항, 제25-27항(일부)

제3군: 청구항 제15-24항, 제25-27항(일부)

상기 제1군 내지 제3군을 비교하면, 동일하거나 연관된 특별한 기술적 특징은 '프로모터, 멀티 클로닝 위치 및 터미네이터를 포함하는 발현 모듈; 및 선택 마커; 및 상기 선택 마커의 양쪽 말단에 결합된 loxP 서열을 포함하는 레스큐 모듈을 포함하는 효모 발현벡터'에 관한 것이나, 이 출원의 출원 전에 공개된 하기 인용문헌에 상기 특별한 기술적 특징이 기재되어 있어서, 상기 발명들 간의 특별한 기술적 특징은 신규성 또는 진보성이 인정될 수 없습니다.

인용문헌1: Fang Fang 등. Yeast. Published online 2010.10.08, Vol. 28, No. 2, 페이지 123-136.
A vector set for systematic metabolic engineering in *Saccharomyces cerevisiae*

인용문헌2: Diana Wider 등. Molecular and Biochemical Parasitology. 2009, Vol. 164, No. 2, 페이지 147-152. The complementation of yeast with human or *Plasmodium falciparum* Hsp90 confers differential inhibitor sensitivities

따라서 상기 3개군의 발명들 간에는 선행기술에 비해 개선된 동일하거나 연관된 특별한 기술적 특징을 가지고 있는 것으로 볼 수 없으므로, 이 출원은 발명의 단일성 요건을 만족하지 못합니다[PCT Rules 13.1 and 13.2].