

(19) Weltorganisation für geistiges Eigentum
Internationales Büro



(43) Internationales Veröffentlichungsdatum
30. August 2007 (30.08.2007)

PCT

(10) Internationale Veröffentlichungsnummer
WO 2007/096387 A1

(51) Internationale Patentklassifikation:
C12N 15/82 (2006.01)

(21) Internationales Aktenzeichen: PCT/EP2007/051675

(22) Internationales Anmeldedatum:
21. Februar 2007 (21.02.2007)

(25) Einreichungssprache: Deutsch

(26) Veröffentlichungssprache: Deutsch

(30) Angaben zur Priorität:
10 2006 008 030.0
21. Februar 2006 (21.02.2006) DE
06120309.7 7. September 2006 (07.09.2006) EP

(71) Anmelder (für alle Bestimmungsstaaten mit Ausnahme von US): BASF PLANT SCIENCE [DE/DE]; BPS - A30, 67056 Ludwigshafen (DE).

(72) Erfinder; und

(75) Erfinder/Anmelder (nur für US): CIRPUS, Petra [DE/DE]; Landteilstrasse 12, 68163 Mannheim (DE). BAUER, Jörg [DE/DE]; Maxburgstrasse 6, 67117 Limburgerhof (DE). QIU, Xiao [CA/CA]; 403 Kendarline Road, Saskatoon, Saskatchewan S7N 3S5 (CA). WU, Guohai [CA/CA]; 2103 Kendarline Road, Saskatoon, Saskatchewan S7N 3S5 (CA). CHENG, Bifang [CA/CA]; Pbi, 110 Gymnasium Road, Saskatoon, Saskatchewan S7N 0W9 (CA). TRUKSA, Martin [CA/CA]; 110 Gymnasium Road, Saskatoon, Saskatchewan S7N 0W9 (CA). WETJEN, Tom [DE/DE]; Meerwiesenstrasse 21, 68163 Mannheim (DE).

(74) Anwalt: NEUEFEIND, Regina; Maiwald Patentanwalts GmbH, Elisenhof, Elisenstrasse 3, 80335 München (DE).

(81) Bestimmungsstaaten (soweit nicht anders angegeben, für jede verfügbare nationale Schutzrechtsart): AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, 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, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, LY, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PG, PH, PL, PT, RO, RS, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, SV, SY, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW.

(84) Bestimmungsstaaten (soweit nicht anders angegeben, für jede verfügbare regionale Schutzrechtsart): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LS, MW, MZ, NA, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), eurasisches (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), europäisches (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, NL, PL, PT, RO, SE, SI, SK, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

Veröffentlicht:

- mit internationalem Recherchenbericht
- vor Ablauf der für Änderungen der Ansprüche geltenden Frist; Veröffentlichung wird wiederholt, falls Änderungen eintreffen
- mit dem Sequenzprotokollteil der Beschreibung in elektronischer Form getrennt veröffentlicht; auf Antrag vom Internationalen Büro erhältlich

Zur Erklärung der Zweibuchstaben-Codes und der anderen Abkürzungen wird auf die Erklärungen ("Guidance Notes on Codes and Abbreviations") am Anfang jeder regulären Ausgabe der PCT-Gazette verwiesen.

(54) Title: METHOD FOR PRODUCING POLYUNSATURATED FATTY ACIDS

(54) Bezeichnung: VERFAHREN ZUR HERSTELLUNG VON MEHRFACH UNGESÄTTIGTEN FETTSÄUREN

(57) Abstract: The invention relates to a method for producing eicosapentanoic acid, docosapentanoic acid and/or docohexanoic acid in transgenic plants. According to said method, the plant is provided with at least one nucleic acid sequence coding for a polypeptide with a $\Delta 6$ desaturase activity, at least one nucleic acid sequence coding for a polypeptide with a $\Delta 6$ elongase activity, at least one nucleic acid sequence coding for a polypeptide with a $\Delta 5$ desaturase activity, and at least one nucleic acid sequence coding for a polypeptide with a $\Delta 5$ elongase activity, the nucleic acid sequence coding for a polypeptide with a $\Delta 5$ elongase activity being modified in relation to the nucleic acid sequence in the organism from which the sequence originates, such that it is adapted to the codon use in at least one type of plant. For the production of docosahexanoic acid, at least one nucleic acid sequence coding for a polypeptide with a $\Delta 4$ desaturase activity is also introduced into the plant.

(57) Zusammenfassung: Die vorliegende Erfindung betrifft ein Verfahren zur Herstellung von Eicosapentaensäure, Docosapentaensäure und/oder Docosahexaensäure in transgenen Pflanzen, indem in der Pflanze bereitgestellt werden mindestens eine Nukleinsäuresequenz, welche für ein Polypeptid mit einer $\Delta 6$ -Desaturase-Aktivität kodiert; mindestens eine Nukleinsäuresequenz, welche für ein Polypeptid mit einer $\Delta 6$ -Elongase-Aktivität kodiert; mindestens eine Nukleinsäuresequenz, welche für ein Polypeptid mit einer $\Delta 5$ -Desaturase-Aktivität kodiert; und mindestens eine Nukleinsäuresequenz, welche für ein Polypeptid mit einer $\Delta 5$ -Elongase-Aktivität kodiert, wobei die Nukleinsäuresequenz, welche für ein Polypeptid mit einer $\Delta 5$ -Elongase-Aktivität kodiert, gegenüber der Nukleinsäuresequenz in dem Organismus, aus dem die Sequenz stammt, dadurch verändert ist, dass sie an die Kodonverwendung in einer oder mehreren Pflanzenarten angepasst ist. Für die Herstellung von Docosahexaensäure wird zusätzlich eine oder mehrere Nukleinsäuresequenzen, die für ein Polypeptid mit einer $\Delta 4$ -Desaturase-Aktivität kodiert, in die Pflanze eingebracht.

WO 2007/096387 A1

Verfahren zur Herstellung von mehrfach ungesättigten Fettsäuren

5 Die vorliegende Erfindung betrifft ein Verfahren zur Herstellung von Eicosapentaensäure, Docosapentaensäure und/oder Docosahexaensäure in transgenen Pflanzen, indem in der Pflanze bereitgestellt werden mindestens eine Nukleinsäuresequenz, welche für ein Polypeptid mit einer $\Delta 6$ -Desaturase-Aktivität kodiert; mindestens eine Nukleinsäuresequenz, welche für ein Polypeptid mit einer $\Delta 6$ -Elongase-Aktivität kodiert; mindestens eine

10 Nukleinsäuresequenz, welche für ein Polypeptid mit einer $\Delta 5$ -Desaturase-Aktivität kodiert; und mindestens eine Nukleinsäuresequenz, welche für ein Polypeptid mit einer $\Delta 5$ -Elongase-Aktivität kodiert,

wobei die Nukleinsäuresequenz, welche für ein Polypeptid mit einer $\Delta 5$ -Elongase-Aktivität kodiert, gegenüber der Nukleinsäuresequenz in dem Organismus, aus dem die Sequenz

15 stammt, dadurch verändert ist, dass sie an die Kodonverwendung in einer oder mehreren Pflanzenarten angepasst ist.

In einer bevorzugten Ausführungsform werden zusätzlich weitere Nukleinsäuresequenzen, die für ein Polypeptid mit der Aktivität einer $\omega 3$ -Desaturase und/oder einer $\Delta 4$ -Desaturase

20 kodieren, in der Pflanze bereitgestellt.

In einer weiteren bevorzugten Ausführungsform werden weitere Nukleinsäuresequenzen, die für Acyl-CoA-Dehydrogenase(n), Acyl-ACP(= acyl carrier protein)-Desaturase(n), Acyl-ACP-Thioesterase(n), Fettsäure-Acyl-Transferase(n), Acyl-CoA:Lysophospholipid-

25 Acyltransferase(n), Fettsäure-Synthase(n), Fettsäure-Hydroxylase(n), Acetyl-Coenzym A-Carboxylase(n), Acyl-Coenzym A-Oxidase(n), Fettsäure-Desaturase(n), Fettsäure-Acetylenasen, Lipoxygenasen, Triacylglycerol-Lipasen, Allenoxid-Synthasen, Hydroperoxid-Lyasen oder Fettsäure-Elongase(n) kodieren, in der Pflanze bereitgestellt.

Die Erfindung betrifft weiterhin rekombinante Nukleinsäuremoleküle, umfassend mindestens eine Nukleinsäuresequenz, die für ein Polypeptid mit einer $\Delta 6$ -Desaturase-Aktivität kodiert; mindestens eine Nukleinsäuresequenz, die für ein Polypeptid mit einer $\Delta 5$ -Desaturase-Aktivität kodiert; mindestens eine Nukleinsäuresequenz, die für ein Polypeptid mit einer $\Delta 6$ -Elongase-Aktivität kodiert; und mindestens eine Nukleinsäuresequenz, die für ein Polypeptid mit einer $\Delta 5$ -Elongase-Aktivität kodiert und die gegenüber der Nukleinsäuresequenz in dem Organismus, aus dem die Sequenz stammt, dadurch verändert ist, dass sie an die Kodonverwendung in einer oder mehreren Pflanzenarten angepasst ist.

10

Ein weiterer Teil der Erfindung betrifft Öle, Lipide und/oder Fettsäuren, die nach dem erfindungsgemäßen Verfahren hergestellt wurden, und deren Verwendung.

15

Schließlich betrifft die Erfindung auch transgene Pflanzen, die nach dem erfindungsgemäßen Verfahren hergestellt wurden oder die ein erfindungsgemäßes rekombinantes Nukleinsäuremolekül enthalten, und deren Verwendung als Nahrungs- oder Futtermittel.

20

Die Lipidsynthese lässt sich in zwei Abschnitte unterteilen: die Synthese von Fettsäuren und ihre Bindung an sn-Glycerin-3-Phosphat sowie die Addition oder Modifikation einer polaren Kopfgruppe. Übliche Lipide, die in Membranen verwendet werden, umfassen Phospholipide, Glycolipide, Sphingolipide und Phosphoglyceride. Die Fettsäuresynthese beginnt mit der Umwandlung von Acetyl-CoA in Malonyl-CoA durch die Acetyl-CoA-Carboxylase oder in Acetyl-ACP durch die Acetyltransacylase. Nach einer Kondensationsreaktion bilden diese beiden Produktmoleküle zusammen Acetoacetyl-ACP, das über eine Reihe von Kondensations-, Reduktions- und Dehydratisierungsreaktionen umgewandelt wird, so dass ein gesättigtes Fettsäuremolekül mit der gewünschten Kettenlänge erhalten wird. Die Produktion der ungesättigten Fettsäuren aus diesen Molekülen wird durch spezifische Desaturasen katalysiert, und zwar entweder aerob mittels molekularem Sauerstoff oder anaerob (bezüglich

25

der Fettsäuresynthese in Mikroorganismen siehe F.C. Neidhardt et al. (1996) *E. coli* und *Salmonella*. ASM Press: Washington, D.C., S. 612-636 und darin enthaltene Literaturstellen; Lengeler et al. (Hrsgb.) (1999) *Biology of Prokaryotes*. Thieme: Stuttgart, New York, und die enthaltene Literaturstellen, sowie Magnuson, K., et al. (1993) *Microbiological Reviews* 57:522-542 und die enthaltenen Literaturstellen). Die so hergestellten an Phospholipide gebundenen Fettsäuren müssen anschließend für die weiteren Elongationen aus den Phospholipiden wieder in den FettsäureCoA-Ester-Pool überführt werden. Dies ermöglichen Acyl-CoA:Lysophospholipid-Acyltransferasen. Weiterhin können diese Enzyme die elongierten Fettsäuren wieder von den CoA-Estern auf die Phospholipide übertragen. Diese Reaktionsabfolge kann gegebenenfalls mehrfach durchlaufen werden.

Ferner müssen Fettsäuren anschließend an verschiedene Modifikationsorte transportiert und in das Triacylglycerin-Speicherlipid eingebaut werden. Ein weiterer wichtiger Schritt bei der Lipidsynthese ist der Transfer von Fettsäuren auf die polaren Kopfgruppen, beispielsweise durch Glycerin-Fettsäure-Acyltransferase (siehe Frentzen, 1998, *Lipid*, 100(4-5):161-166).

Eine Übersicht über die Pflanzen-Fettsäurebiosynthese, Desaturierung, den Lipidstoffwechsel und Membrantransport von fetthaltigen Verbindungen, die Betaoxidation, Fettsäuremodifikation und Cofaktoren, Triacylglycerin-Speicherung und –Assemblierung geben einschließlich der Literaturstellen die folgenden Artikel: Kinney (1997) *Genetic Engineering*, Hrsgb.: JK Setlow, 19:149-166; Ohlrogge und Browse (1995) *Plant Cell* 7:957-970; Shanklin und Cahoon (1998) *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 49:611-641; Voelker (1996) *Genetic Engineering*, Hrsgb.: JK Setlow, 18:111-13; Gerhardt (1992) *Prog. Lipid R.* 31:397-417; Gühnemann-Schäfer & Kindl (1995) *Biochim. Biophys Acta* 1256:181-186; Kunau et al. (1995) *Prog. Lipid Res.* 34:267-342; Stymne et al. (1993) in: *Biochemistry and Molecular Biology of Membrane and Storage Lipids of Plants*, Hrsgb.: Murata und Somerville, Rockville, American Society of Plant Physiologists, 150-158; Murphy & Ross (1998) *Plant Journal*. 13(1):1-16.

Die mehrfach ungesättigten Fettsäuren können entsprechend ihrem Desaturierungsmuster in zwei große Klassen, die ω -6- und die ω -3-Fettsäuren, eingeteilt werden, die metabolisch und funktionell unterschiedliche Aktivitäten haben.

5

Im Folgenden werden mehrfach ungesättigte Fettsäuren als PUFA, PUFAs, LCPUFA oder LCPUFAs bezeichnet (poly unsaturated fatty acids, PUFA, mehrfach ungesättigte Fettsäuren; long chain poly unsaturated fatty acids, LCPUFA, langkettige mehrfach ungesättigte Fettsäuren).

10

Als Ausgangsstoff für den ω -6-Stoffwechselweg fungiert die Fettsäure Linolsäure ($18:2^{\Delta 9,12}$), während der ω -3-Weg über Linolensäure ($18:3^{\Delta 9,12,15}$) abläuft. Linolensäure wird dabei durch die Aktivität einer ω -3-Desaturase aus Linolsäure gebildet (Tocher et al. (1998) Prog. Lipid Res. 37: 73-117 ; Domergue et al. (2002) Eur. J. Biochem. 269: 4105-4113).

15

Säugetiere und damit auch der Mensch verfügen über keine entsprechende Desaturaseaktivität (Δ -12- und ω -3-Desaturase) zur Bildung dieser Ausgangsstoffe und müssen daher diese Fettsäuren (essentielle Fettsäuren) über die Nahrung aufnehmen. Über eine Abfolge von Desaturase- und Elongase-Reaktionen werden dann aus diesen Vorstufen die physiologisch wichtigen mehrfach ungesättigten Fettsäuren Arachidonsäure (= ARA, $20:4^{\Delta 5,8,11,14}$), eine ω -6-Fettsäure und die beiden ω -3-Fettsäuren Eicosapentaen- (= EPA, $20:5^{\Delta 5,8,11,14,17}$) und Docosahexaensäure (DHA, $22:6^{\Delta 4,7,10,13,17,19}$) synthetisiert.

20

Die Verlängerung von Fettsäuren durch Elongasen um 2 bzw. 4 C-Atome ist für die Produktion von C_{20} - bzw. C_{22} -PUFAs von entscheidender Bedeutung. Dieser Prozess verläuft über 4 Stufen. Den ersten Schritt stellt die Kondensation von Malonyl-CoA an das Fettsäure-Acyl-CoA durch die Ketoacyl-CoA-Synthase (KCS, im weiteren Text als Elongase bezeichnet) dar. Es folgt dann ein Reduktionsschritt (Ketoacyl-CoA-Reduktase, KCR), ein

25

Explore Litigation Insights

Docket Alarm provides insights to develop a more informed litigation strategy and the peace of mind of knowing you're on top of things.

Real-Time Litigation Alerts



Keep your litigation team up-to-date with **real-time alerts** and advanced team management tools built for the enterprise, all while greatly reducing PACER spend.

Our comprehensive service means we can handle Federal, State, and Administrative courts across the country.

Advanced Docket Research



With over 230 million records, Docket Alarm's cloud-native docket research platform finds what other services can't. Coverage includes Federal, State, plus PTAB, TTAB, ITC and NLRB decisions, all in one place.

Identify arguments that have been successful in the past with full text, pinpoint searching. Link to case law cited within any court document via Fastcase.

Analytics At Your Fingertips



Learn what happened the last time a particular judge, opposing counsel or company faced cases similar to yours.

Advanced out-of-the-box PTAB and TTAB analytics are always at your fingertips.

API

Docket Alarm offers a powerful API (application programming interface) to developers that want to integrate case filings into their apps.

LAW FIRMS

Build custom dashboards for your attorneys and clients with live data direct from the court.

Automate many repetitive legal tasks like conflict checks, document management, and marketing.

FINANCIAL INSTITUTIONS

Litigation and bankruptcy checks for companies and debtors.

E-DISCOVERY AND LEGAL VENDORS

Sync your system to PACER to automate legal marketing.