



(12) Translation of
European patent specification

(11) NO/EP 3346008 B1

NORWAY

(19) NO
(51) Int Cl.
C12N 15/52 (2006.01)
C12N 9/04 (2006.01)
C12N 9/10 (2006.01)
C12N 9/12 (2006.01)
C12N 9/88 (2006.01)
C12P 5/00 (2006.01)

Norwegian Industrial Property Office

(45)	Translation Published	2021.03.01
(80)	Date of The European Patent Office Publication of the Granted Patent	2020.10.07
(86)	European Application Nr.	18156987.2
(86)	European Filing Date	2013.06.04
(87)	The European Application's Publication Date	2018.07.11
(30)	Priority	2012.06.01, US, 201261654412 P
(84)	Designated Contracting States:	AL ; AT ; BE ; BG ; CH ; CY ; CZ ; DE ; DK ; EE ; ES ; FI ; FR ; GB ; GR ; HR ; HU ; IE ; IS ; IT ; LI ; LT ; LU ; LV ; MC ; MK ; MT ; NL ; NO ; PL ; PT ; RO ; RS ; SE ; SI ; SK ; SM ; TR
(62)	Divided application	EP2855662, 2013.06.04
(73)	Proprietor	LanzaTech New Zealand Limited, Level 11, 41 Shortland Street, Auckland 1010, New Zealand
(72)	Inventor	CHEN, Wendy, 24 Balfour RoadParnell, 1052 Auckland, New Zealand LIEW, FungMin, 24 Balfour RoadParnell, 1052 Auckland, New Zealand KOEPE, Michael, 24 Balfour RoadParnell, 1052 Auckland, New Zealand
(74)	Agent or Attorney	ZACCO NORWAY AS, Postboks 488, 0213 OSLO, Norge

(54) Title **RECOMBINANT MICROORGANISMS AND USES THEREFOR**

(56) References
Cited: WO-A1-2011/160081, WO-A2-2012/034023, WO-A1-2010/148150
WO-A1-2009/094485, M. KOPKE ET AL: "2,3-Butanediol Production by Acetogenic Bacteria, an Alternative Route to Chemical Synthesis, Using Industrial Waste Gas", APPLIED AND ENVIRONMENTAL MICROBIOLOGY, vol. 77, no. 15, 17 June 2011 (2011-06-17) , pages 5467-5475, XP055104754, ISSN: 0099-2240, DOI: 10.1128/AEM.00355-11
M. KOPKE ET AL: "Clostridium ljungdahlii represents a microbial production platform based on syngas", PROCEEDINGS NATIONAL ACADEMY OF SCIENCES PNAS, vol. 107, no. 29, 2 July 2010 (2010-07-02) , pages 13087-13092, XP055086327, US ISSN: 0027-8424, DOI: 10.1073/pnas.1004716107

Enclosed is a translation of the patent claims in Norwegian. Please note that as per the Norwegian Patents Acts, section 66i the patent will receive protection in Norway only as far as there is agreement between the translation and the language of the application/patent granted at the EPO. In matters concerning the validity of the patent, language of the application/patent granted at the EPO will be used as the basis for the decision. The patent documents published by the EPO are available through Espacenet (<http://worldwide.espacenet.com>) or via the search engine on our website here: <https://search.patentstyret.no/>

3346008

1

Patentkrav**1. Fremgangsmåte for fremstilling av isopren, omfattende:**

- (I) å oppnå et gassformet substrat som omfatter karbonmonoksid og/eller karbondioksid, fra en industriell prosess valgt fra gruppen bestående av fremstilling av jernmetallprodukter, fremstilling av ikke-jernmetallprodukter, oljeraffinering, kullforgassing, produksjon av elektrisk kraft, sotproduksjon, ammoniakkproduksjon, metanolproduksjon og koksframstilling; og
- (II) å bringe det gassformede substrat som omfatter karbonmonoksid og/eller karbondioksid, i kontakt med en rekombinant mikroorganisme omfattende en nukleinsyre som koder for isoprensyntase, slik at den rekombinante mikroorganisme kan produsere isopren fra karbonmonoksidet og/eller karbondioksidet;

hvor den rekombinante mikroorganisme fremstilles ved å introdusere en nukleinsyre som koder for isoprensyntase, i en parental mikroorganisme av *Clostridium autoethanogenum*, *Clostridium ljungdahlii*, *Clostridium ragsdalei*, *Clostridium carboxidivorans*, *Clostridium drakei*, *Clostridium scatologenes*, *Clostridium aceticum*, *Clostridium formicoaceticum*, *Clostridium magnum*, *Butyribacterium methylotrophicum*, *Acetobacterium woodii*, *Alkalibaculum bacchii*, *Blautia producta*, *Eubacterium limosum*, *Moorella thermoacetica*, *Moorella thermautotrophica*, *Sporomusa ovata*, *Sporomusa silvacetica*, *Sporomusa sphaeroides*, *Oxobacter pfennigii* eller *Thermoanaerobacter kiuvi*.

2. Fremgangsmåte ifølge krav 1, hvor det gassformede substrat omfatter karbonmonoksid og hydrogen, eller karbondioksid og hydrogen.

25

3. Fremgangsmåte ifølge krav 2, hvor det gassformede substrat er en syntesegass.

4. Fremgangsmåte ifølge et hvilket som helst av de foregående krav, hvor den rekombinante mikroorganisme videre omfatter en nukleinsyre som koder for et eksogent enzym som virker i en mevalontavei, hvor den rekombinante mikroorganisme er i stand til å produsere isopentenylidifosfat gjennom

30

3346008

2

mevalonatveien.

- 5.** Fremgangsmåte ifølge krav 4, hvor nukleinsyren som koder for det eksogene enzym som virker i mevalonatveien, velges blant mevalonatkinase, mevalonatdifosfatdekarboksylase, fosfomevalonatkinase, tiolase, 3-hydroksy-3-metylglutarylkoenzym A (HMG-CoA)-reduktase og HMG-CoA-syntase.
- 6.** Fremgangsmåte ifølge krav 4 eller 5, hvor mevalonatveien er den av gjær.
- 7.** Fremgangsmåte ifølge krav 6, hvor gjæren er *Saccharomyces*.
- 8.** Fremgangsmåte ifølge et hvilket som helst av de foregående krav, hvor den rekombinante mikroorganisme videre omfatter en nukleinsyre som koder for i det minste ett enzym som virker i en DXS-vei, hvor DXS-veien:
- (a) ikke er naturlig til stede i den parentale mikroorganisme; eller
- (b) er naturlig til stede i den parentale mikroorganisme.
- 9.** Fremgangsmåte ifølge krav 8, hvor nukleinsyren som koder for i det minste ett enzym som virker i DXS-veien, velges blant 1-deoksy-D-xylulose-5-fosfatsyntase DXS, 1-deoksy-D-xylulose-5-fosfatreduktoisomerase DXR, 2-C-metyl-D-erytritol-4-fosfatcytidyltransferase IspD, 4-difosfocytidyl-2-C-metyl-D-erytritolkinase IspE, 2-C-metyl-D-erytritol-2,4-syklodifosfatsyntase IspF, 4-hydroksy-3-metylbut-2-en-1-yldifosfatesyntase IspG og 4-hydroksy-3-metylbut-2-enyldifosfatreduktase.
- 10.** Fremgangsmåte ifølge et hvilket som helst av de foregående krav, hvor isoprensyntasen er avledet fra en plante.
- 11.** Fremgangsmåte ifølge et hvilket som helst av de foregående krav, hvor nukleinsyren som koder for isoprensyntase, er:
- (a) en sekvens som representeres av SEQ ID NO: 21; eller
- (b) en sekvens som har en identitet på 90% eller mer med aminosyresekvensen som representeres av SEQ ID NO: 21.

3346008

3

12. Fremgangsmåte ifølge et hvilket som helst av de foregående krav, hvor nukleinsyren er kodonoptimert.

13. Fremgangsmåte ifølge et hvilket som helst av de foregående krav, hvor:

- 5 (a) nukleinsyren er integrert i den rekombinante mikroorganismes genom;
 og/eller
 (b) nukleinsyren er integrert i et plasmid.

14. Fremgangsmåte ifølge et hvilket som helst av de foregående krav, hvor den
10 rekombinante mikroorganisme velges blant *Clostridium autoethanogenum* og *Clostridium ljungdahlii*.

15. Anvendelse av den rekombinante mikroorganisme ifølge et hvilket som helst av de foregående krav, i en fremgangsmåte for fremstilling av isopren, omfattende:

- 15 (I) å oppnå et gassformet substrat som omfatter karbonmonoksid og/eller
 karbondioksid, fra en industriell prosess valgt fra gruppen bestående av
 fremstilling av jernmetallprodukter, fremstilling av ikke-jernmetallprodukter,
 oljeraffinering, kullforgassing, produksjon av elektrisk kraft, sotproduksjon,
 ammoniakkproduksjon, metanolproduksjon og koksframstilling; og
20 (II) å bringe det gassformede substrat som omfatter karbonmonoksid og/eller
 karbondioksid, i kontakt med nevnte rekombinante mikroorganisme for å
 produsere isopren fra karbonmonoksidet og/eller karbondioksidet.