



(12) Translation of
European patent specification

(11) NO/EP 3615667 B1

NORWAY

(19) NO
(51) Int Cl.
C12N 9/10 (2006.01)
C12N 15/52 (2006.01)
C12P 7/22 (2006.01)
C12P 17/06 (2006.01)

Norwegian Industrial Property Office

(45)	Translation Published	2022.01.17
(80)	Date of The European Patent Office Publication of the Granted Patent	2021.08.11
(86)	European Application Nr.	18728259.5
(86)	European Filing Date	2018.04.27
(87)	The European Application's Publication Date	2020.03.04
(30)	Priority	2017.04.27, US, 201762491114 P 2017.10.07, US, 201762569532 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
(73)	Proprietor	The Regents of the University of California, 1111 Franklin Street, 12th Floor, Oakland, CA 94607, USA
(72)	Inventor	KEASLING, Jay D., 2150 Shattuck Ave. Suite 510, Berkeley California 94704, USA D'ESPAUX, Leo, 2150 Shattuck Ave. Suite 510, Berkeley California 94704, USA WONG, Jeff, 2150 Shattuck Ave. Suite 510, Berkeley California 94704, USA LUO, Xiaozhou, 2150 Shattuck Ave. Suite 510, Berkeley California 94704, USA REITER, Michael, 2150 Shattuck Ave. Suite 510, Berkeley California 94704, USA DENBY, Charles, 2150 Shattuck Ave. Suite 510, Berkeley California 94704, USA LECHNER, Anna, 2150 Shattuck Ave. Suite 510, Berkeley California 94704, USA
(74)	Agent or Attorney	BRYN AARFLOT AS, Stortingsgata 8, 0161 OSLO, Norge

(54)	Title	MICROORGANISMS AND METHODS FOR PRODUCING CANNABINOIDS AND CANNABINOID DERIVATIVES
------	-------	--

(56)	References Cited:	US-A1- 2016 010 126, US-A1- 2012 144 523, WO-A1-2019/014490, WO-A1-2019/071000, EP-A1- 3 067 058, Sayed Hussein Farag Hussein: "Cannabinoids production in Cannabis sativa L.: An in vitro approach", von der Fakultät Bio- und Chemieingenieurwesen der Technischen Universität Dortmund genehmigte Dissertation , 1 January 2014 (2014-01-01), XP055487626, Retrieved from the Internet: URL: https://eldorado.tu-dortmund.de/bitstream/2003/34350/1/Dissertation.pdf [retrieved on 2018-06-25] ISVETT JOSEFINA FLORES-SANCHEZ ET AL: "Secondary metabolism in cannabis", PHYTOCHEMISTRY REVIEWS, KLUWER ACADEMIC PUBLISHERS, DO, vol. 7, no. 3, 8 April 2008 (2008-04-08), pages 615-639, XP019613387, ISSN: 1572-980X DATABASE EMBL [Online] 16 October 2011 (2011-10-16), "TSA: Cannabis sativa PK15523.1_1.CasaPuKu mRNA sequence.", XP002782462, retrieved from EBI accession no. EM_TSA:JP460119 Database accession no. JP460119
------	-------------------	---

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/>

Patentkrav

1. Genmodifisert gjærceUe for fremstilling av et cannabinoid eller et cannabinoidderivat, den genmodifiserte gjærceUen omfattende én eller flere heterologe nukleinsyrer integrert i et kromosom i den genmodifiserte gjærceUen og som koder for et geranylpyrofosfat:olivetoljesyregeranyltransferasepolypeptid omfattende en aminosyresekvens som har minst 85 % sekvensidentitet til SEQ ID NO:110 eller SEQ ID NO:100.
2. Den genmodifiserte gjærceUen ifølge krav 1, hvori den genmodifiserte gjærceUen omfatter én eller flere heterologe nukleinsyrer integrert i et kromosom i den genmodifiserte gjærceUen og som koder for et tetraketidsyntase-(TKS)-polypeptid og én eller flere heterologe nukleinsyrer integrert i et kromosom i den genmodifiserte gjærceUen og som koder for et olivetoljesyresyklase-(OAC)-polypeptid.
3. Den genmodifiserte gjærceUen ifølge krav 1 eller 2, hvori den genmodifiserte gjærceUen omfatter én eller flere av følgende:
 - a) én eller flere heterologe nukleinsyrer som koder for et polypeptid som genererer en acyl-CoA-forbindelse eller et acyl-CoA-forbindelsesderivat; eller
 - b) én eller flere heterologe nukleinsyrer som koder for et polypeptid som genererer geranylpyrofosfat.
4. Den genmodifiserte gjærceUen ifølge et hvilket som helst av kravene 1–3, hvori den genmodifiserte gjærceUen omfatter én eller flere av følgende:
 - a) én eller flere heterologe nukleinsyrer som koder for et HMG-CoA-syntase-(HMGS)-polypeptid;
 - b) én eller flere heterologe nukleinsyrer som koder for et 3-hydroksy-3-metyl-glutaryl-CoA-reduktase-(HMGR)-polypeptid;
 - c) én eller flere heterologe nukleinsyrer som koder for et mevalonatkinase-(MK)-polypeptid;
 - d) én eller flere heterologe nukleinsyrer som koder for et fosfomevalonatkinase-(PMK)-polypeptid;
 - e) én eller flere heterologe nukleinsyrer som koder for et mevalonatpyrofosfatdekarboksylase-(MVD)-polypeptid; eller
 - f) én eller flere heterologe nukleinsyrer som koder for et isopentenylidifosfatisomerase-(IDI)-polypeptid.

5. Den genmodifiserte gjærcellen ifølge krav 4, hvori den genmodifiserte gjærcellen omfatter én eller flere heterologe nukleinsyrer som koder for et polypeptid som kondenserer to molekyler av acetyl-CoA for å generere acetoacetyl-CoA og hvori polypeptidet som kondenserer to molekyler av acetyl-CoA for å generere acetoacetyl-CoA er et acetoacetyl-CoA-tiolasepolypeptid.

6. Den genmodifiserte gjærcellen ifølge et hvilket som helst av kravene 1–5, hvori gjærcellen er *Saccharomyces cerevisiae*.

7. Den genmodifiserte gjærcellen ifølge et hvilket som helst av kravene 1–6, hvori den genmodifiserte gjærcellen omfatter én eller flere heterologe nukleinsyrer som koder for et cannabinoidsyntasepolypeptid, hvori cannabinoidsyntasepolypeptidet er et tetrahydrocannabinolsyre-(THCA)-syntasepolypeptid eller et cannabidiolsyre-(CBDA)-syntasepolypeptid.

8. Den genmodifiserte gjærcellen ifølge krav 7, hvori THCA-syntasepolypeptidet omfatter en aminosyresekvens som har minst 85 % sekvensidentitet til SEQ ID NO:155 og CBDA-syntasepolypeptidet omfatter en aminosyresekvens som har minst 85 % sekvensidentitet til SEQ ID NO:88 eller SEQ ID NO:151.

9. Den genmodifiserte gjærcellen ifølge et hvilket som helst av kravene 1–8, hvori den genmodifiserte gjærcellen omfatter én eller flere av følgende:

a) én eller flere heterologe nukleinsyrer som koder for et polypeptid som genererer en acyl-CoA-forbindelse eller et acyl-CoA-forbindelsesderivat, hvori polypeptidet som genererer en acyl-CoA-forbindelse eller et acyl-CoA-forbindelsesderivat er et acylaktiverende enzym-(AAE)-polypeptid omfattende en aminosyresekvens som har minst 85 % sekvensidentitet til SEQ ID NO:90, SEQ ID NO:92 eller SEQ ID NO:149; et fettacyl-CoA-ligasepolypeptid omfattende en aminosyresekvens som har minst 85 % sekvensidentitet til SEQ ID NO:145 eller SEQ ID NO:147; eller et fettacyl-CoA-syntetase-(FAA)-polypeptid omfattende en aminosyresekvens som har minst 85 % sekvensidentitet til SEQ ID NO:169, SEQ ID NO:192, SEQ ID NO:194, SEQ ID NO:196, SEQ ID NO:198 eller SEQ ID NO:200;

b) én eller flere heterologe nukleinsyrer som koder for et polypeptid som genererer geranylpyrofosfat, hvori polypeptidet som genererer geranylpyrofosfat er et

geranylpyrofosfatsyntetase-(GPPS)-polypeptid omfattende en aminosyresekvens som har minst 85 % sekvensidentitet til SEQ ID NO:60;

c) én eller flere heterologe nukleinsyrer som koder for et HMG-CoA-syntase-(HMGS)-polypeptid omfattende en aminosyresekvens som har minst 85 % sekvensidentitet til SEQ ID NO:115;

d) én eller flere heterologe nukleinsyrer som koder for et 3-hydroksy-3-metyl-glutaryl-CoA-reduktase-(HMGR)-polypeptid omfattende en aminosyresekvens som har minst 85 % sekvensidentitet til SEQ ID NO:208;

e) én eller flere heterologe nukleinsyrer som koder for et mevalonatkinase-(MK)-polypeptid omfattende en aminosyresekvens som har minst 85 % sekvensidentitet til SEQ ID NO:64;

f) én eller flere heterologe nukleinsyrer som koder for et fosfomevalonatkinase-(PMK)-polypeptid omfattende en aminosyresekvens som har minst 85 % sekvensidentitet til SEQ ID NO:205;

g) én eller flere heterologe nukleinsyrer som koder for et mevalonatpyrofosfatdekarboksylase-(MVD)-polypeptid omfattende en aminosyresekvens som har minst 85 % sekvensidentitet til SEQ ID NO:66;

h) én eller flere heterologe nukleinsyrer som koder for et isopentenylidifosfatisomerase-(IDI)-polypeptid omfattende en aminosyresekvens som har minst 85 % sekvensidentitet til SEQ ID NO:58;

i) én eller flere heterologe nukleinsyrer som koder for et polypeptid som kondenserer to molekyler av acetyl-CoA for å generere acetoacetyl-CoA, hvori polypeptidet som kondenserer to molekyler av acetyl-CoA for å generere acetoacetyl-CoA er et acetoacetyl-CoA-tiolasepolypeptid omfattende en aminosyresekvens som har minst 85 % sekvensidentitet til SEQ ID NO:25; eller

j) én eller flere heterologe nukleinsyrer integrert i et kromosom i den genmodifiserte gjærcellen og som koder for et tetraketidsyntase-(TKS)-polypeptid omfattende en aminosyresekvens som har minst 85 % sekvensidentitet til SEQ ID NO:11 og én eller flere heterologe nukleinsyrer integrert i et kromosom i den genmodifiserte gjærcellen og som koder for et olivetoljesyresyklase-(OAC)-polypeptid omfattende en aminosyresekvens som har minst 85 % sekvensidentitet til SEQ ID NO:10.

10. Fremgangsmåte for fremstilling av et cannabinoid eller et cannabinoidderivat, fremgangsmåten omfattende:

a) å dyrke en genmodifisert gjærceUe omfattende:

i) én eller flere heterologe nukleinsyrer integrert i et kromosom i den genmodifiserte gjærceUen og som koder for et geranylpyrofosfat:olivetoljesyregeranyltransferasepolypeptid omfattende en aminosyresekvens som har minst 85 % sekvensidentitet til SEQ ID NO:110 eller
5 SEQ ID NO:100; og

ii) én eller flere heterologe nukleinsyrer integrert i et kromosom i den genmodifiserte gjærceUen og som koder for et tetraketidsyntase-(TKS)-polypeptid omfattende aminosyresekvensen ifølge SEQ ID NO:11; og/eller

10 iii) én eller flere heterologe nukleinsyrer integrert i et kromosom i den genmodifiserte gjærceUen og som koder for et olivetoljesyresyklase-(OAC)-polypeptid omfattende aminosyresekvensen ifølge SEQ ID NO:10;

i et egnet medium som inneholder en karboksylsyre; og

b) å utvinne det fremstilte cannabinoidet eller cannabinoidderivatet.

15 11. Fremgangsmåten ifølge krav 10, hvori TKS-polypeptidet omfatter en aminosyresekvens som har minst 85 % sekvensidentitet til SEQ ID NO:11 og OAC-polypeptidet omfatter en aminosyresekvens som har minst 85 % sekvensidentitet til SEQ ID NO:10.

20 12. Fremgangsmåten ifølge krav 10 eller 11, hvori karboksylsyren er heksansyre, smørsyre, valerinsyre eller derivat derav omfattende én eller flere funksjonelle eller reaktive grupper valgt fra azido, halogen, metyl, alkyl, alkynyl, alkenyl, metoksy, alkoksy, acetyl, amino, karboksyl, karbonyl, okso, ester, hydroksyl, tio, cyano, aryl, heteroaryl, sykloalkyl, sykloalkenyl, sykloalkylalkenyl, sykloalkylalkynyl, sykloalkenylalkyl, sykloalkenylalkenyl, sykloalkenylalkynyl, heterosyklylalkenyl, heterosyklylalkynyl, heteroarylalkenyl, heteroarylalkynyl, arylalkenyl, arylalkynyl, spirosyklyl, heterospirosyklyl, heterosyklyl, tioalkyl, sulfon, sulfonyl, sulfoksid, amido, alkylamino, dialkylamino, arylamino, alkylarylamin, diarylamino, N-oksid, imid, enamino, imin, oksim, hydrazon, nitril, aralkyl, sykloalkylalkyl, halogenalkyl, heterosyklylalkyl, heteroarylalkyl, nitro, tiokso, azid, amin, ester, cyano, tioester, tioeter, sulfonylhaloid, alkohol, tiol, suksinimidylester, isotiocyanat,
30 jodacetamid, maleimid, hydrazin, alkynyl og alkenyl, hvori karboksylsyren eventuelt er heksansyre og hvori cellekulturen fremstiller cannabinoidet eller cannabinoidderivatet i en konsentrasjon på ca. 1 mg/l til ca. 500 mg/l.

13. Fremgangsmåten ifølge krav 10 eller 11, hvori cannabinoidet er cannabigerolsyre,

cannabigerolsyremonometyleter (CBGAM), cannabigerol, cannabigerolmonometyleter, Δ^9 -trans-tetrahydrocannabinol, Δ^9 -tetrahydrocannabinolsyre, Δ^9 -tetrahydrocannabinolsyre A, Δ^9 -tetrahydrocannabinolsyre B, Δ^9 -tetrahydrocannabinolsyre-C₄, Δ^9 -tetrahydrocannabinol-C₄, Δ^9 -tetrahydrocannabivarinsyre, Δ^9 -tetrahydrocannabivarin, Δ^9 -tetrahydrocannabiorkolinsyre, Δ^9 -tetrahydrocannabiorcol, Δ^7 -cis-iso-tetrahydrocannabivarin, Δ^9 -tetrahydrocannabinol, Δ^8 -tetrahydrocannabinolsyre, Δ^8 -trans-tetrahydrocannabinol, Δ^8 -tetrahydrocannabinol, cannabidiolsyre, cannabidiol, cannabidiolmonometyleter (CBDM), cannabidiol-C₄ (CBD-C₄), cannabidiorcol (CBD-C₁), cannabitriol, cannabikromensyre, cannabikromen, cannabinolsyre, cannabinol, cannabinolmetyleter, cannabinol-C₄, cannabinol-C₂, cannabidivarinsyre, cannabidivarin, tetrahydrocannabivarinsyre, tetrahydrocannabivarin, cannabikromevarinsyre, cannabikromevarin, cannabigerovarinsyre, cannabigerovarin, cannabisyklolinsyre, cannabisyklol, cannabisyklovarin, cannabielsoinsyre A, cannabielsoinsyre B, cannabielsoinsyre, cannabielsoin, cannabicitransyre eller cannabicitran.

14. Fremgangsmåte for fremstilling av et cannabinoid eller cannabinoidderivat, fremgangsmåten omfattende:

a) å dyrke en genmodifisert gjærceile omfattende:

i) én eller flere heterologe nukleinsyrer integrert i et kromosom i den genmodifiserte gjærceilen og som koder for et geranylpyrofosfat:olivetolsyregeranyltransferasepolypeptid omfattende en aminosyresekvens som har minst 85 % sekvensidentitet til SEQ ID NO:110 eller SEQ ID NO:100;

ii) én eller flere heterologe nukleinsyrer integrert i et kromosom i den genmodifiserte gjærceilen og som koder for et tetraketidsyntase-(TKS)-polypeptid omfattende en aminosyresekvens som har minst 85 % sekvensidentitet til SEQ ID NO:11;

iii) én eller flere heterologe nukleinsyrer integrert i et kromosom i den genmodifiserte gjærceilen og som koder for et olivetoljesyresyklase-(OAC)-polypeptid omfattende en aminosyresekvens som har minst 85 % sekvensidentitet til SEQ ID NO:10;

iv) én eller flere heterologe nukleinsyrer som koder for ett eller flere polypeptider som genererer geranylpyrofosfat, hvori polypeptidet som genererer geranylpyrofosfat er et geranylpyrofosfatsyntetase-(GPPS)-polypeptid omfattende en aminosyresekvens som har minst 85 % sekvensidentitet til SEQ ID NO:60;

v) én eller flere heterologe nukleinsyrer som koder for ett eller flere polypeptider som genererer en acyl-CoA-forbindelse eller et acyl-CoA-forbindelsesderivat hvori polypeptidet som genererer en acyl-CoA-forbindelse eller et acyl-CoA-forbindelsesderivat er et acylaktiverende

enzym-(AAE)-polypeptid omfattende en aminosyresekvens som har minst 85 % sekvensidentitet til SEQ ID NO:90, SEQ ID NO:92 eller SEQ ID NO:149; et fettacyl-CoA-ligasepolypeptid omfattende en aminosyresekvens som har minst 85 % sekvensidentitet til SEQ ID NO:145 eller SEQ ID NO:147; eller et fettacyl-CoA-syntetase-(FAA)-polypeptid omfattende
 5 en aminosyresekvens som har minst 85 % sekvensidentitet til SEQ ID NO:169, SEQ ID NO:192, SEQ ID NO:194, SEQ ID NO:196, SEQ ID NO:198, eller SEQ ID NO:200; og

vi) én eller flere heterologe nukleinsyrer som koder for ett eller flere polypeptider som genererer malonyl-CoA, hvori polypeptidet som genererer malonyl-CoA er et acetyl-CoA-karboksylase-1-(ACC1)-polypeptid omfattende en aminosyresekvens som har minst 85 %
 10 sekvensidentitet til SEQ ID NO:9, SEQ ID NO:97 eller SEQ ID NO:207;

i et egnet medium; og

b) å utvinne det fremstilte cannabinoidet eller cannabinoidderivatet,

hvori den genmodifiserte gjærcellen eventuelt omfatter én eller flere heterologe nukleinsyrer som koder for et THCA-syntasepolypeptid omfattende en aminosyresekvens som
 15 har minst 85 % sekvensidentitet til SEQ ID NO:155 eller et CBDA-syntasepolypeptid omfattende en aminosyresekvens som har minst 85 % sekvensidentitet til SEQ ID NO:88 eller SEQ ID NO:151; og/eller hvori minst én av de heterologe nukleinsyrene integrert i et kromosom i den genmodifiserte gjærcellen er operativt knyttet til en induserbar promotor.

20 15. Fremgangsmåte for fremstilling av et cannabinoid eller et cannabinoidderivat, fremgangsmåten omfattende anvendelse av en genmodifisert gjærceelle omfattende en heterolog nukleinsyre integrert i et kromosom i den genmodifiserte gjærcellen og som koder for et geranylpyrofosfat:olivetolsyregeranyltransferasepolypeptid omfattende en aminosyresekvens som har minst 85 % sekvensidentitet til SEQ ID NO:110 eller SEQ ID NO: 100.