(12) NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES PATENTWESENS (PCT) VERÖFFENTLICHTE INTERNATIONALE ANMELDUNG

(19) Weltorganisation für geistiges Eigentum
Internationales Büro

(43) Internationales Veröffentlichungsdatum
29. Juli 2004 (29.07.2004)

PCT

(10) Internationale Veröffentlichungsnummer
WO 2004/063359 A3

(51) Internationale Patentklassifikation[7]: C12N 1/15, 15/80, C12P 23/00, A23J 1/00, 3/00, A23L 1/28, 1/275

(21) Internationales Aktenzeichen: PCT/EP2004/000099

(22) Internationales Anmeldedatum:
9. Januar 2004 (09.01.2004)

(25) Einreichungssprache: Deutsch

(26) Veröffentlichungssprache: Deutsch

(30) Angaben zur Priorität:
103 00 649.4 9. Januar 2003 (09.01.2003) DE
103 41 271.9 8. September 2003 (08.09.2003) DE

(71) Anmelder *(für alle Bestimmungsstaaten mit Ausnahme von US)*: **BASF AKTIENGESELLSCHAFT** [DE/DE]; 67056 Ludwigshafen (DE).

(72) Erfinder; und

(75) Erfinder/Anmelder *(nur für US)*: **MATUSCHEK, Markus** [DE/DE]; Karolinenstr. 5, 69469 Weinheim (DE). **KLEIN, Daniela** [DE/DE]; M 7, 2, 68161 Mannheim (DE). **HEINEKAMP, Thorsten** [DE/DE]; Alte Ziegelei 1B, 30419 Hannover (DE). **SCHMIDT, Andre** [DE/DE]; Magdeburger Str. 11, 31832 Springe (DE). **BRAKHAGE, Axel** [DE/DE]; Schneiderberg 58, 30167 Hannover (DE). **ACHATZ, Brigitte** [DE/DE]; Windeckstr. 26, 68163 Mannheim (DE).

(74) Anwalt: **FITZNER, Uwe**; Lintorfer Str. 10, 40878 Ratingen (DE).

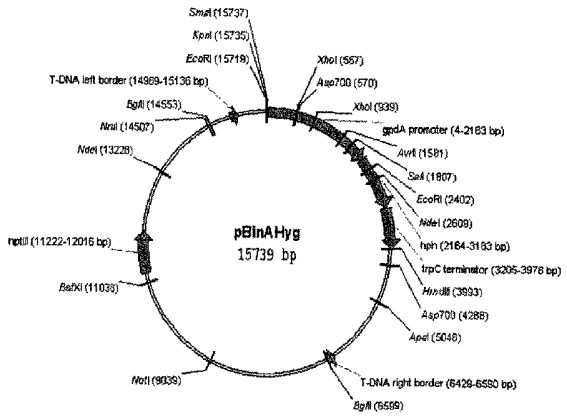
(81) Bestimmungsstaaten *(soweit nicht anders angegeben, für jede verfügbare nationale Schutzrechtsart)*: AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, EG, ES,

[Fortsetzung auf der nächsten Seite]

(54) Title: METHOD FOR PRODUCING CAROTENOIDS OR THEIR PRECURSORS USING GENETICALLY MODIFIED ORGANISMS OF THE *BLAKESLEA* GENUS, CAROTENOIDS OR THEIR PRECURSORS PRODUCED BY SAID METHOD AND USE THEREOF

(54) Bezeichnung: VERFAHREN ZUR HERSTELLUNG VON CAROTINOIDEN ODER DEREN VORSTUFEN MITTELS GENTECHNISCH VERÄNDERTER ORGANISMEN DER GATTUNG *BLAKESLEA*, MIT DEM VERFAHREN HERGESTELLTE CAROTINOIDE ODER DEREN VORSTUFEN UND DEREN VERWENDUNG

AA **Vektor pBinAHyg**



AA...VECTOR PBinAHyg

(57) Abstract: The invention relates to a method for producing carotenoids or their precursors using genetically modified organisms of the *Blakeslea* genus. Said method comprises the following steps (i) transformation of at least one of the cells, (ii) optional homokaryotic conversion of the cells obtained in step (i) to produce cells, in which one or more genetic characteristics of the nucleii are all modified in an identical manner and said modification manifests itself in the cells, (iii) selection and reproduction of the genetically modified cell or cells, (iv) cultivation of the genetically modified cells, (v) preparation of the carotenoids produced by the genetically modified cells or the carotenoid precursor produced by said genetically modified cells. The invention also relates to carotenoids or their precursors produced according to said method and to the use thereof.

[Fortsetzung auf der nächsten Seite]

WO 2004/063359 A3

FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NA, NI, NO, NZ, OM, PG, PH, PL, PT, RO, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SY, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, YU, ZA, ZM, ZW.

(84) Bestimmungsstaaten *(soweit nicht anders angegeben, für jede verfügbare regionale Schutzrechtsart)*: ARIPO (BW, GH, GM, KE, LS, MW, MZ, 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, IT, LU, MC, NL, 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*

(88) Veröffentlichungsdatum des internationalen Recherchenberichts: 27. Januar 2005

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.

(57) Zusammenfassung: Verfahren zur Herstellung von Carotinoiden oder deren Vorstufen mittels gentechnisch veränderter Organismen der Gattung *Blakeslea* umfassend (i) Transformation mindestens einer der Zellen, (ii) ggf. Homokaryotisierung der aus (i) erhaltenen Zellen, so dass Zellen entstehen, in denen die Kerne in einem oder in mehreren genetischen Merkmalen alle gleichartig verändert sind und diese genetische Veränderung zur Ausprägung bringen, und (ix) Selektion und Vermehrung der gentechnisch veränderten Zelle oder Zellen, (x) Kultivierung der gentechnisch veränderten Zellen, (xi) Bereitstellung des von den gentechnisch veränderten Zellen produzierten Carotinoids oder der von den gentechnischen veränderten Zellen produzierten Carotinoidvorstufe; nach dem Verfahren hergestellte Carotinoide oder deren Vorstufen und deren Verwendung.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Inter | Application No
PCT/EP2004/000099

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
IPC 7 C12N1/15 C12N15/80 C12P23/00 A23J1/00 A23J3/00
A23L1/28 A23L1/275

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)
IPC 7 C12N C12P A23J A23L

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)
EPO-Internal, BIOSIS

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category °	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO 98/46772 A (BOVENBERG ROELOF ARY LANS ;GIST BROCADES BV (NL); SELTEN GERARDUS) 22 October 1998 (1998-10-22) the whole document	1-21
A	US 6 413 736 B1 (JOLLY SETSUKO OMATA ET AL) 2 July 2002 (2002-07-02) the whole document	
A	US 2002/051998 A1 (SCHMIDT-DANNERT CLAUDIA ET AL) 2 May 2002 (2002-05-02) the whole document	

-/--

[X] Further documents are listed in the continuation of box C.

[X] Patent family members are listed in 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 document 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	Date of mailing of the international search report
28 May 2004	24. 11. 2004

Name and mailing address of the ISA	Authorized officer
European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl, Fax: (+31-70) 340-3016	Vogt, T

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Inter...l Application No
PCT/EP2004/000099

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category °	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	LEE P C ET AL: "Metabolic engineering towards biotechnological production of carotenoids in microorganisms." APPLIED MICROBIOLOGY AND BIOTECHNOLOGY, vol. 60, no. 1-2, October 2002 (2002-10), pages 1-11, XP002282395 ISSN: 0175-7598 the whole document	
A	WO 98/03480 A (SIBEYN MIEKE ;GIST BROCADE B V (NL); PATER ROBERTUS MATTHEUS DE (N) 29 January 1998 (1998-01-29) the whole document	
A	WO 98/50574 A (SIBEIJN MIEKE ;GIST BROCADES BV (NL); PATER ROBERTUS MATTHEUS DE () 12 November 1998 (1998-11-12) the whole document	

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
EP2004/000099

Box I Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 1 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 II Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 2 of first sheet)

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

See supplemental 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 an additional fee, this Authority did not invite payment of any additional fee.

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.: **1-21**

Remark on Protest

☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest.

☐ No protest accompanied the payment of additional search fees.

The International Searching Authority has determined that this international application contains multiple (groups of) inventions, namely

1. Claims 1-21

   method of preparing carotenoids or precursors thereof by means of genetically modified organisms of the Blakeslea genus.

   ---

2. Claims 22-47

   method of providing carotenoids, foodstuffs and nutritional supplements.

   ---

3. Claims 48-53

   carotenoids, foodstuffs and nutritional supplements produced according to the methods indicated by inventions 1 and 2.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Inter I Application No
PCT/EP2004/000099

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 9846772 A	22-10-1998	AU 7642298 A	11-11-1998
		BR 9808859 A	01-08-2000
		CN 1257546 T	21-06-2000
		WO 9846772 A2	22-10-1998
		EP 0979294 A2	16-02-2000
		JP 2001518798 T	16-10-2001
		PL 336345 A1	19-06-2000
		US 6432672 B1	13-08-2002
US 6413736 B1	02-07-2002	US 6015684 A	18-01-2000
		US 5922560 A	13-07-1999
		US 5466599 A	14-11-1995
		US 2003049241 A1	13-03-2003
		AU 688280 B2	12-03-1998
		AU 5008693 A	08-11-1994
		EP 0708604 A1	01-05-1996
		JP 8508885 T	24-09-1996
		NO 954052 A	11-12-1995
		NZ 255742 A	26-05-1997
		WO 9423594 A1	27-10-1994
US 2002051998 A1	02-05-2002	AU 2257401 A	18-06-2001
		EP 1238068 A1	11-09-2002
		WO 0142455 A1	14-06-2001
WO 9803480 A	29-01-1998	AU 3696197 A	10-02-1998
		WO 9803480 A1	29-01-1998
		EP 0912506 A1	06-05-1999
		JP 2000515742 T	28-11-2000
		US 2002025548 A1	28-02-2002
WO 9850574 A	12-11-1998	AU 7530598 A	27-11-1998
		WO 9850574 A1	12-11-1998
		EP 0979302 A1	16-02-2000
		JP 2001523966 T	27-11-2001
		US 2002055135 A1	09-05-2002

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Inte ales Aktenzeichen
PCT/EP2004/000099

A. KLASSIFIZIERUNG DES ANMELDUNGSGEGENSTANDES
IPK 7 C12N1/15 C12N15/80 C12P23/00 A23J1/00 A23J3/00
A23L1/28 A23L1/275

Nach der Internationalen Patentklassifikation (IPK) oder nach der nationalen Klassifikation und der IPK

B. RECHERCHIERTE GEBIETE

Recherchierter Mindestprüfstoff (Klassifikationssystem und Klassifikationssymbole)
IPK 7 C12N C12P A23J A23L

Recherchierte aber nicht zum Mindestprüfstoff gehörende Veröffentlichungen, soweit diese unter die recherchierten Gebiete fallen

Während der internationalen Recherche konsultierte elektronische Datenbank (Name der Datenbank und evtl. verwendete Suchbegriffe)
EPO-Internal, BIOSIS

C. ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie°	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
X	WO 98/46772 A (BOVENBERG ROELOF ARY LANS ;GIST BROCADES BV (NL); SELTEN GERARDUS) 22. Oktober 1998 (1998-10-22) das ganze Dokument	1-21
A	US 6 413 736 B1 (JOLLY SETSUKO OMATA ET AL) 2. Juli 2002 (2002-07-02) das ganze Dokument	
A	US 2002/051998 A1 (SCHMIDT-DANNERT CLAUDIA ET AL) 2. Mai 2002 (2002-05-02) das ganze Dokument	

-/--

[X] Weitere Veröffentlichungen sind der Fortsetzung von Feld C zu entnehmen

[X] Siehe Anhang Patentfamilie

° Besondere Kategorien von angegebenen Veröffentlichungen :
"A" Veröffentlichung, die den allgemeinen Stand der Technik definiert, aber nicht als besonders bedeutsam anzusehen ist
"E" älteres Dokument, das jedoch erst am oder nach dem internationalen Anmeldedatum veröffentlicht worden ist
"L" Veröffentlichung, die geeignet ist, einen Prioritätsanspruch zweifelhaft erscheinen zu lassen, oder durch die das Veröffentlichungsdatum einer anderen im Recherchenbericht genannten Veröffentlichung belegt werden soll oder die aus einem anderen besonderen Grund angegeben ist (wie ausgeführt)
"O" Veröffentlichung, die sich auf eine mündliche Offenbarung, eine Benutzung, eine Ausstellung oder andere Maßnahmen bezieht
"P" Veröffentlichung, die vor dem internationalen Anmeldedatum, aber nach dem beanspruchten Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist
"T" Spätere Veröffentlichung, die nach dem internationalen Anmeldedatum oder dem Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist und mit der Anmeldung nicht kollidiert, sondern nur zum Verständnis des der Erfindung zugrundeliegenden Prinzips oder der ihr zugrundeliegenden Theorie angegeben ist
"X" Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann allein aufgrund dieser Veröffentlichung nicht als neu oder auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden
"Y" Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann nicht als auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden, wenn die Veröffentlichung mit einer oder mehreren anderen Veröffentlichungen dieser Kategorie in Verbindung gebracht wird und diese Verbindung für einen Fachmann naheliegend ist
"&" Veröffentlichung, die Mitglied derselben Patentfamilie ist

Datum des Abschlusses der internationalen Recherche	Absendedatum des internationalen Recherchenberichts
28. Mai 2004	24. 11. 2004

Name und Postanschrift der Internationalen Recherchenbehörde	Bevollmächtigter Bediensteter
Europäisches Patentamt, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL – 2280 HV Rijswijk Tel. (+31–70) 340–2040, Tx. 31 651 epo nl, Fax: (+31–70) 340–3016	Vogt, T

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Int...nales Aktenzeichen
PCT/EP2004/000099

C.(Fortsetzung) ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie°	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
A	LEE P C ET AL: "Metabolic engineering towards biotechnological production of carotenoids in microorganisms." APPLIED MICROBIOLOGY AND BIOTECHNOLOGY, Bd. 60, Nr. 1-2, Oktober 2002 (2002-10), Seiten 1-11, XP002282395 ISSN: 0175-7598 das ganze Dokument	
A	WO 98/03480 A (SIBEYN MIEKE ;GIST BROCADE B V (NL); PATER ROBERTUS MATTHEUS DE (N) 29. Januar 1998 (1998-01-29) das ganze Dokument	
A	WO 98/50574 A (SIBEIJN MIEKE ;GIST BROCADES BV (NL); PATER ROBERTUS MATTHEUS DE () 12. November 1998 (1998-11-12) das ganze Dokument	

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Internationales Aktenzeichen
PCT/EP2004/000099

Feld II Bemerkungen zu den Ansprüchen, die sich als nicht recherchierbar erwiesen haben (Fortsetzung von Punkt 2 auf Blatt 1)

Gemäß Artikel 17(2)a) wurde aus folgenden Gründen für bestimmte Ansprüche kein Recherchenbericht erstellt:

1. ☐ Ansprüche Nr.
weil sie sich auf Gegenstände beziehen, zu deren Recherche die Behörde nicht verpflichtet ist, nämlich

2. ☐ Ansprüche Nr.
weil sie sich auf Teile der internationalen Anmeldung beziehen, die den vorgeschriebenen Anforderungen so wenig entsprechen, daß eine sinnvolle internationale Recherche nicht durchgeführt werden kann, nämlich

3. ☐ Ansprüche Nr.
weil es sich dabei um abhängige Ansprüche handelt, die nicht entsprechend Satz 2 und 3 der Regel 6.4 a) abgefaßt sind.

Feld III Bemerkungen bei mangelnder Einheitlichkeit der Erfindung (Fortsetzung von Punkt 3 auf Blatt 1)

Die internationale Recherchenbehörde hat festgestellt, daß diese internationale Anmeldung mehrere Erfindungen enthält:

siehe Zusatzblatt

1. ☐ Da der Anmelder alle erforderlichen zusätzlichen Recherchengebühren rechtzeitig entrichtet hat, erstreckt sich dieser internationale Recherchenbericht auf alle recherchierbaren Ansprüche.

2. ☐ Da für alle recherchierbaren Ansprüche die Recherche ohne einen Arbeitsaufwand durchgeführt werden konnte, der eine zusätzliche Recherchengebühr gerechtfertigt hätte, hat die Behörde nicht zur Zahlung einer solchen Gebühr aufgefordert.

3. ☐ Da der Anmelder nur einige der erforderlichen zusätzlichen Recherchengebühren rechtzeitig entrichtet hat, erstreckt sich dieser internationale Recherchenbericht nur auf die Ansprüche, für die Gebühren entrichtet worden sind, nämlich auf die Ansprüche Nr.

4. ☒ Der Anmelder hat die erforderlichen zusätzlichen Recherchengebühren nicht rechtzeitig entrichtet. Der internationale Recherchenbericht beschränkt sich daher auf die in den Ansprüchen zuerst erwähnte Erfindung; diese ist in folgenden Ansprüchen erfaßt:
1-21

Bemerkungen hinsichtlich eines Widerspruchs

☐ Die zusätzlichen Gebühren wurden vom Anmelder unter Widerspruch gezahlt.

☐ Die Zahlung zusätzlicher Recherchengebühren erfolgte ohne Widerspruch.

Die internationale Recherchenbehörde hat festgestellt, dass diese internationale Anmeldung mehrere (Gruppen von) Erfindungen enthält, nämlich:

Erfindung 1: Ansprüche 1-21

Verfahren zur Herstellung von Carotinoiden oder deren Vorstufen mittels gentechnisch veränderter Organismen der Gattung Blakeslea.

Erfindung 2: Ansprüche 22-47

Verfahren zur Bereitstellung von Carotinoiden, Nahrungsmitteln und Nahrungsergänzungsmitteln.

Erfindung 3: Ansprüche 48-53

Carotinoide, Nahrungsmittel und Nahrungergänzungsmittel erhältlich nach den Verfahren der Erfindungen 1 und 2.

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Internationales Aktenzeichen
PCT/EP2004/000099

Im Recherchenbericht angeführtes Patentdokument		Datum der Veröffentlichung	Mitglied(er) der Patentfamilie		Datum der Veröffentlichung
WO 9846772	A	22-10-1998	AU	7642298 A	11-11-1998
			BR	9808859 A	01-08-2000
			CN	1257546 T	21-06-2000
			WO	9846772 A2	22-10-1998
			EP	0979294 A2	16-02-2000
			JP	2001518798 T	16-10-2001
			PL	336345 A1	19-06-2000
			US	6432672 B1	13-08-2002
US 6413736	B1	02-07-2002	US	6015684 A	18-01-2000
			US	5922560 A	13-07-1999
			US	5466599 A	14-11-1995
			US	2003049241 A1	13-03-2003
			AU	688280 B2	12-03-1998
			AU	5008693 A	08-11-1994
			EP	0708604 A1	01-05-1996
			JP	8508885 T	24-09-1996
			NO	954052 A	11-12-1995
			NZ	255742 A	26-05-1997
			WO	9423594 A1	27-10-1994
US 2002051998	A1	02-05-2002	AU	2257401 A	18-06-2001
			EP	1238068 A1	11-09-2002
			WO	0142455 A1	14-06-2001
WO 9803480	A	29-01-1998	AU	3696197 A	10-02-1998
			WO	9803480 A1	29-01-1998
			EP	0912506 A1	06-05-1999
			JP	2000515742 T	28-11-2000
			US	2002025548 A1	28-02-2002
WO 9850574	A	12-11-1998	AU	7530598 A	27-11-1998
			WO	9850574 A1	12-11-1998
			EP	0979302 A1	16-02-2000
			JP	2001523966 T	27-11-2001
			US	2002055135 A1	09-05-2002