

PŘIHLÁŠKA VYNÁLEZU

zveřejněná podle § 31 zákona č. 527/1990 Sb.

(21) Číslo dokumentu:

2002 -297

(13) Druh dokumentu: **A3**

(51) Int. Cl. ⁷:

C 12 N 15/60

C 12 N 9/88

C 12 N 15/76

C 12 N 1/21

C 12 P 17/18

C 12 P 19/62

//(C 12 N 15/60, C 12 R 1:465)

(19)
ČESKÁ
REPUBLIKA



ÚŘAD
PRŮMYSLOVÉHO
VLASTNICTVÍ

(22) Přihlášeno: **19.07.2000**

(32) Datum podání prioritní přihlášky: **12.08.1999**

(31) Číslo prioritní přihlášky: **1999/372934**

(33) Země priority: **US**

(40) Datum zveřejnění přihlášky vynálezu: **14.08.2002**
(Věstník č. 8/2002)

(86) PCT číslo: **PCT/IB00/00996**

(87) PCT číslo zveřejnění: **WO01/12822**

(71) Přihlašovatel:

PFIZER PRODUCTS INC., Groton, CT, US;

(72) Původce:

Stutzman-Engwall Kim Jonelle, Groton, CT, US;

(74) Zástupce:

Matějka Jan JUDr., Národní 32, Praha, 11000;

(54) Název přihlášky vynálezu:

**Gen Streptomyces avermitilis řídící poměr B2:B1
avermektinů**

(57) Anotace:

Řešení se týká polynukleotidových molekul obsahujících nukleotidové sekvence kódující produkt genu aveC, kteréžto polynukleotidové sekvence mohou být použity k narušení poměru nebo množství třídy 2:1 avermektinů produkovaných ve fermentačních kulturách *S. avermitilis*. Dále se týká vektorů, hostitelských buněk a zmutovaných kmenů *S. avermitilis*, v kterých byl gen aveC inaktivován nebo mutován tak, že došlo ke změně vytvářeného poměru nebo množství třídy 2:1 avermektinů.

Gen ze *Streptomyces avermilitis* řídící poměr B2: B1 avermektinů 3884

1. Oblast techniky

Předkládaný vynález se týká preparátů a způsobů přípravy avermektinů primárně v oboru zdraví živočichů. Konkrétněji se předkládaný vynález týká polynukleotidových molekul obsahujících nukleotidové sekvence kódující produkt genu *aveC*, který může být použit k modulaci poměru třídy 2:1 avermektinů produkovaných fermentací kultur *S. avermilitis*, a preparátů a způsobů vyhledávání takových polynukleotidových molekul. Předkládaný vynález se dále týká vektorů, transformovaných hostitelských buněk a nových mutovaných kmenů *S. avermilitis*, v kterých byl gen *aveC* inaktivován nebo mutován tak, že došlo ke modulaci vytvářeného poměru nebo množství třídy 2:1 avermektinů.

2. Dosavadní stav techniky

2.1. Avermektiny

Streptomyces produkují celou řadu sekundárních metabolitů včetně avermektinů, které zahrnují sérii osmi příbuzných šestnáctičlenných makrocyclických laktonů majících silnou antihelmintickou a insekticidální aktivitu. Osm odlišných a blízkce příbuzných sloučenin je označováno jako A1a, A1b, A2a, A2b, B1a, B1b, B2a a B2b. Série "a" sloučenin se týká přirozeného avermektinu, kde substituentem v pozici C25 je (S)-sec-butyl, a "b" série sloučenin se týká těch sloučenin, kde substituentem v C5 pozici je izopropyl. Označení "A" a "B" se týká avermektinů, kde substituent v C5 pozici je metoxy, respektive hydroxy skupina. Číslo "1" se týká avermektinů, kde dvojná vazba je přítomná v pozici C22,23 a číslo "2" se týká avermektinů majících vodík v pozici C22 a hydroxy skupinu v pozici C23. Mezi příbuznými avermektiny je typ B1 avermektinu rozeznáván jako avermektin mající nejúčinnější

antiparazitickou a pesticidovou aktivitu a je proto komerčně nejvíce žádoucím avermektinem.

Avermektiny a jejich produkce aerobní fermentací kmenů *S. avermitemilis* jsou popsány v patentech United States Patents 4310519 a 4429042. Biosyntéza přirozených avermektinů je pravděpodobně zahajována endogenně z CoA thioesterových analogů kyseliny izomáselné a kyseliny S-(+)-2-metylmáselné.

Kombinace zlepšení kmene náhodnou mutagenezí i použití exogenně dodaných mastných kyselin vedlo k účinné tvorbě analog avermektinu. Mutanty *S. avermitemilis* s deficiencí dehydrogenázy 2-oxo kyselin (bkd deficientní mutanty) mohou produkovat avermektiny pouze, jsou-li fermentace suplementovány mastnými kyselinami. Vyhledávání a izolace mutant s deficiencí dehydrogenázové aktivity větvených řetězců (například *S. avermitemilis*, ATCC 535567) jsou popsány v patentu European Patent (EP) 276103. Fermentace takových mutant v přítomnosti exogenně dodaných mastných kyselin vede k produkci pouze čtyř avermektinů odpovídajících použitým mastným kyselinám. Takto dochází suplementací fermentací *S. avermitemilis* (ATCC 53567) S-(+)-2-metylmáselnou kyselinou k tvorbě přirozených avermektinů A1a, A2a, B1a a B2a, suplementace fermentací kyselinou izomáselnou vede k tvorbě přirozených avermektinů A1b, A2b, B1b a B2b, a suplementace fermentací kyselinou cyklopentankarboxylovou vede k tvorbě čtyř nových cyklopentylavermektinů A1, A2, B1 a B2.

Pokud je provedena suplementace jinými mastnými kyselinami, dochází k tvorbě nových avermektinů. Vyhledáváním více než 800 potenciálních prekurzorů bylo identifikováno více než 60 dalších nových avermektinů (viz například Dutton et al., 1991, J Antibiot 44:357-367, a Banks et al., 1994, Roy Soc Chem 147:16-26). Mutanty *S. avermitemilis* s deficiencí aktivity 5-O-

metyltransferázy navíc produkují zásadně pouze B analogové avermektiny. Mutanty *S. avermitilis* bez aktivity dehydrogenázy větvených 2-oxo kyselin i 5-O-methyltransferázy produkují pouze B avermektiny odpovídající mastným kyselinám použitým k suplementaci fermentace. Suplementace takových dvojitéch mutant *S-(+)-2-metylmáseľnou* kyselinou vede k tvorbě pouze přirozených avermektinů B1a a B2, zatímco suplementace kyselinou izomáseľnou nebo cyklopentankarboxylovou vede k tvorbě přirozených avermektinů B1b a B2b, nebo nových cyklopentyl B1 a B2 avermektinů. Suplementace dvojitéch zmutovaných kmenů cyklohexan karboxylovou kyselinou je přednostní způsob pro produkci komerčně důležitého nového avermektinu, cyklohexylavermektinu B1 (doramektinu). Izolace a charakteristiky takových dvojitéch mutantů, například *S. avermitilis* (ATCC 53692) jsou popsány v EP 276103.

2.2. Geny hrající roli v biosyntéze avermektinů

V mnoha případech jsou geny hrající roli v produkci sekundárních metabolitů a geny kódující konkrétní antibiotikum nacházeny ve shlucích na chromozómu. Toto je případ například shluků genů *Streptomyces* pro polyketid syntázu (PKS) (viz Hopwood a Sherman, 1990, Ann Rev Genet 24:37-66). Jednou ze strategií klonování genů v biosyntetické dráze byla izolace genu pro lékovou rezistenci a poté testování přilehlých oblastí chromozómu na další geny mající vztah k biosyntéze takového konkrétního antibiotika. Další ze strategií klonování genů hrajících roli v biosyntéze důležitých metabolitů byla komplementace mutantů. Části DNA knihovny z organismu produkujícího konkrétní metabolit jsou vloženy do neprodukujícího mutovaného kmene a transformované kmeny jsou vyhledávány podle tvorby metabolitu. Navíc byla použita k identifikaci a klonování genů v biosyntetických drahách hybridizace knihovny za použití prób odvozených z kmenů *Streptomyces*.

Geny hrající roli v biosyntéze avermektinu (ave geny), podobně jako geny vyžadované pro biosyntézu jiných sekundárních metabolitů *Streptomyces* (například PKS) jsou nacházeny ve shlucích na chromozómu. Za použití vektorů ke komplemetaci mutantů *S. avermitilis* s blokádou biosyntézy avermektinu byla úspěšně naklonována celá řada ave genů. Klonování takových genů je popsáno v patentu US Patent 5252474. Ikeda et al. 1995, J Antibiot 48:532-534 navíc popsal lokalizaci chromozomální oblasti obsahující C22,23 dehydratační krok (aveC) na fragmentu *S. avermitilis* 4,82 Kb BamHI, stejně tak jako mutace v genu aveC, které vedou k produkci jedné komponenty B2a. Protože ivermektin, účinná antihelmintická sloučenina, může být chemicky produkována z avermektinu B2a, je tento kmen produkující jednu komponentu avermektinu B2a považován za obzvláště užitečný pro komerční tvorbu ivermektinu.

Identifikace mutací aveC genu, které minimalizují komplexnost tvorby avermektinu, jako jsou například mutace, které snižují poměr B2:B1 avermektinů, by mohli zjednodušit produkci a purifikaci komerčně důležitých avermektinů.

3. Popis vynálezu

Předkládaný vynález poskytuje izolovanou polynukleotidovou molekulu obsahující kompletní aveC ORF *S. avermitilis* nebo jeho významnou část, kterážto izolovaná polynukleotidová molekula postrádá další kompletní ORF, který je lokalizován směrem dolů od aveC ORF in situ na chromozómu *S. avermitilis*. Izolovaná polynukleotidová molekula, která je předmětem předkládaného vynálezu obsahuje přednostně nukleotidovou sekvenci, která je stejná jako produkt genu AveC *S. avermitilis* kódující sekvenci plazmidu pSE186 (ATCC 209604), nebo která je stejná jako nukleotidová sekvence aveC ORF z Obrázku 1 (SEQ ID č. 1), nebo

její významná část. Předkládaný vynález dále zahrnuje nukleotidovou sekvenci SEQ ID č.1, nebo její degenerovanou variantu.

Předkládaný vynález dále poskytuje izolovanou polynukleotidovou molekulu mající nukleotidovou sekvenci, která je homologní s produktem genu AveC *S. avermitilis* kódující sekvenci plazmidu pSE186 (ATCC 209604), nebo která je stejná jako nukleotidová sekvence aveC ORF z Obrázku 1 (SEQ ID č. 1), nebo jako její významná část.

Předkládaný vynález dále poskytuje izolovanou polynukleotidovou molekulu obsahující nukleotidovou sekvenci, která kóduje polypeptid mající aminokyselinovou sekvenci, která je homologní s produktem genu AveC *S. avermitilis* kódující sekvenci plazmidu pSE186 (ATCC 209604), nebo jako aminokyselinová sekvence z Obrázku 1 (SEQ ID č. 2), nebo jako její významná část.

Předkládaný vynález dále poskytuje izolovanou polynukleotidovou molekulu obsahující nukleotidovou sekvenci kódující homologní AveC genový produkt. V přednostní formě vynálezu obsahuje izolovaná polynukleotidová molekula nukleotidovou sekvenci kódující homologní AveC produkt genu *S. hygroscopicus*, kterýžto homologní genový produkt obsahuje aminokyselinovou sekvenci SEQ ID č:4, nebo její významnou část. V přednostní formě vynálezu obsahuje izolovaná polynukleotidová molekula, která je předmětem vynálezu, a která kóduje homologní AveC produkt, nukleotidovou sekvenci SEQ ID č:3, nebo její významnou část.

Předkládaný vynález dále poskytuje izolovanou polynukleotidovou molekulu obsahující nukleotidovou sekvenci, která je homologní s nukleotidovou sekvencí SEQ ID NO:3.

Předkládaný vynález dále poskytuje izolovanou polynukleotidovou molekulu obsahující nukleotidovou sekvenci, která kóduje polypeptid, který je homologní s homologním AveC produktem genu *S. hygroscopicus*, mající aminokyselinovou sekvenci SEQ ID č. 4.

Předkládaný vynález dále poskytuje oligonukleotidy, které hybridizují s polynukleotidovou molekulou mající nukleotidovou sekvenci uvedenou na Obrázku 1 (SEQ ID č. 1), nebo SEQ ID č. 3, nebo s polynukleotidovou molekulou mající nukleotidovou sekvenci, která je komplementární s nukleotidovou sekvencí uvedenou na Obrázku 1 (SEQ ID č. 1), nebo SEQ ID č. 3.

Předkládaný vynález dále poskytuje rekombinantní klonovací vektory a expresní vektory, které jsou užitečné pro klonování a expresi polynukleotidu, který je předmětem předkládaného vynálezu, včetně polynukleotidových molekul obsahujících aveC ORF *S. avermitilis* nebo aveC homologní ORF. V nelimitující formě vynálezu poskytuje předkládaný vynález plazmid pSE186 (ATCC 209604), který obsahuje celý ORF aveC genu *S. avermitilis*. Předkládaný vynález dále poskytuje transformované hostitelské buňky obsahující polynukleotidovou molekulu nebo rekombinantní vektor, který je předmětem vynálezu, a nové kmeny, nebo buněčné linie od nich odvozené.

Předkládaný vynález dále poskytuje rekombinantně exprimovaný AveC genový produkt nebo AveC homologní genový produkt, nebo jejich významnou část. Předkládaný vynález dále poskytuje způsob produkce rekombinantního AveC genového produktu, zahrnující kultivaci transformované hostitelské buňky s rekombinantním expresním vektorem, kde řečený rekombinantní expresní vektor obsahuje polynukleotidovou molekulu mající nukleotidovou sekvenci kódující AveC genový produkt nebo AveC

homologní genový produkt, kterážto polynukleotidová molekula je v operačním spojení s jedním nebo více regulačními elementy, které kontrolují expresi polynukleotidové molekuly hostitelské buňky, za podmínek napomáhajících produkci rekombinantního AveC genového produktu nebo AveC homologního genového produktu, a zahrnující získání AveC genového produktu nebo AveC homologního genového produktu z buněčné kultury.

Předkládaný vynález dále poskytuje polynukleotidovou molekulu obsahující nukleotidovou sekvenci, která je jinak stejná jako AveC alela *S. avermitilis*, nebo AveC genový produkt kódující sekvenci plazmidu pSE186 (ATCC 209604), nebo její degenerovanou variantu, nebo nukleotidovou sekvenci *aveC* ORF *S. avermitilis*, jak je uvedeno na Obrázku 1 (SEQ ID č. 1), nebo její degenerovanou variantu, ale která dále obsahuje jednu nebo více mutací, takže buňky kmene *S. avermitilis* ATCC 53692, v kterých byla divoká *aveC* alela inaktivována, a která exprimuje polynukleotidovou molekulu obsahující zmutovanou nukleotidovou sekvenci, produkují odlišný poměr nebo množství avermektinů, které jsou produkovány buňkami kmene *S. avermitilis* ATCC 53692, které místo toho exprimují pouze divoký typ *aveC* alely. Podle předkládaného vynálezu mohou být takové polynukleotidové molekuly použity k produkci nových kmenů *S. avermitilis*, které vykazují detekovatelnou změnu v produkci avermektinu ve srovnání se stejným kmenem, který místo toho exprimuje pouze divoký typ *aveC* alely. V přednostní formě vynálezu jsou takové polynukleotidové molekuly užitečné k produkci nových kmenů *S. avermitilis*, které produkují avermektiny ve sníženém poměru 2:1, ve srovnání se stejným kmenem, který místo toho exprimuje pouze divoký typ *aveC* alely. V další přednostní formě vynálezu jsou takové polynukleotidové molekuly užitečné pro produkci nových kmenů *S. avermitilis*, které produkují zvýšená množství avermektinů ve srovnání se stejným kmenem, který místo toho exprimuje pouze jednu divokou

aveC alelu. V další přednostní formě vynálezu jsou takové polynukleotidové molekuly užitečné pro produkci nových kmenů *S. avermitilis*, v kterých byl aveC gen inaktivován.

Předkládaný vynález poskytuje způsoby identifikace mutací aveC ORF *S. avermitilis* schopných změnit poměr a/nebo množství produkovaných avermektinů. V přednostní formě vynálezu poskytuje předkládaný vynález způsob identifikace mutací aveC ORF schopných změnit poměr třídy 2:1 produkovaných avermektinů, kterýžto způsob zahrnuje: (a) určení poměru třídy 2:1 avermektinů produkovaných buňkami kmene *S. avermitilis*, v kterých byla nativní aveC alela inaktivována, a do kterých byla vložena polynukleotidová molekula obsahující nukleotidovou sekvenci kódující zmutovaný AveC genový produkt, a tato molekula je exprimována; (b) určení poměru třídy 2:1 avermektinů produkovaných buňkami stejného kmene *S. avermitilis* jako v kroku (a), ale kteréžto buňky místo toho exprimují pouze divoký typ aveC alely nebo ORF z Obrázku 1 (SEQ ID č. 1), nebo nukleotidovou sekvenci, která je k ORF homologní; a (c) porovnání poměru třídy 2:1 avermektinů produkovaných buňkami *S. avermitilis* z kroku (a) s poměrem třídy 2:1 avermektinů produkovaných buňkami *S. avermitilis* z kroku (b); takže je-li poměr třídy 2:1 avermektinů produkovaných buňkami *S. avermitilis* z kroku (a) odlišný od poměru třídy 2:1 avermektinů produkovaných buňkami *S. avermitilis* z kroku (b), poté může být identifikována mutace aveC ORF schopná pozměnit poměr třídy 2:1 avermektinů. V přednostní formě vynálezu je poměr třídy 2:1 avermektinů touto mutací snížen.

V další přednostní formě poskytuje předkládaný vynález způsoby identifikace mutací aveC ORF nebo genetických konstruktů obsahujících aveC ORF schopných změnit množství produkovaných avermektinů, kterýžto způsob zahrnuje: (a) určení množství

avermektinů produkovaných buňkami kmene *S. avermitilis*, v kterých byla nativní *aveC* alela inaktivována, a do kterých byla vložena polynukleotidová molekula obsahující nukleotidovou sekvenci kódující zmutovaný *AveC* genový produkt, nebo obsahující genetický konstrukt zahrnující nukleotidovou sekvenci kódující *AveC* genový produkt a tato molekula je exprimována; (b) určení množství avermektinů produkovaných stejným kmenem *S. avermitilis* jako v kroku (a), ale kterýžto kmen místo toho exprimuje pouze jednu *aveC* alelu mající nukleotidovou sekvenci jako ORF z Obrázku 1 (SEQ ID č. 1), nebo nukleotidovou sekvenci, která je k ORF homologní; a (c) porovnání množství avermektinů produkovaných buňkami *S. avermitilis* z kroku (a) s množstvím avermektinů produkovaných buňkami *S. avermitilis* z kroku (b); takže je-li množství avermektinů produkovaných buňkami *S. avermitilis* z kroku (a) odlišné od množství avermektinů produkovaných buňkami *S. avermitilis* z kroku (b), poté může být identifikována mutace *aveC* ORF nebo genetického konstrukt schopná pozměnit poměr třídy 2:1 avermektinů. V přednostní formě vynálezu je produkované množství avermektinů touto mutací zvýšeno.

Předkládaný vynález dále poskytuje rekombinantní vektory, které jsou užitečné pro přípravu nových kmenů *S. avermitilis* s narušenou produkcí avermektinů. Předkládaný vynález navíc poskytuje vektory, které mohou být použity k cílení jakýchkoli polynukleotidových molekul obsahujících mutované nukleotidové sekvence, které jsou předmětem předkládaného vynálezu, do místa *aveC* genu chromozómu *S. avermitilis* buďto k inzerci nebo k nahrazení *aveC* alely nebo ORF nebo jejich části pomocí homologní rekombinace. Podle předkládaného vynálezu však může zde poskytnutá polynukleotidová molekula obsahující mutovanou nukleotidovou sekvenci, která je předmětem předkládaného vynálezu, také modulovat biosyntézu avermektinů, je-li inzerována do chromozómu *S. avermitilis* do místa jiného, než

je místo *aveC* genu, nebo je-li v buňkách *S. avermitilis* udržována epizomálně. Předkládaný vynález tedy poskytuje také vektory obsahující mutovanou polynukleotidovou molekulu obsahující mutovanou nukleotidovou sekvenci, která je předmětem předkládaného vynálezu, kteréžto vektory mohou být použity k inzerci polynukleotidové molekuly do místa v chromozómu *S. avermitilis* jiného, než je místo *aveC* genu, nebo která může být v těchto buňkách udržována epizomálně. V přednostní formě poskytuje předkládaný vynález vektory pro náhradu genu, které mohou být použity k inzerci mutované *aveC* alely do chromozómu *S. avermitilis* za účelem tvorby nových kmenů buněk, které produkují avermektiny ve sníženém poměru třídy 2:1 ve srovnání s buňkami stejného kmene, které exprimují pouze divoký typ *aveC* alely.

Předkládaný vynález dále poskytuje způsoby přípravy nových kmenů *S. avermitilis* zahrnující buňky, které exprimují mutovanou *aveC* alelu, čímž vznikají narušené poměry a/nebo množství avermektinů ve srovnání s buňkami stejného kmene *S. avermitilis*, které exprimují pouze divoký typ *aveC* alely. V přednostní formě vynálezu poskytuje předkládaný vynález způsoby přípravy nových kmenů *S. avermitilis* obsahujících buňky, které exprimují mutovanou *aveC* alelu, čímž vzniká narušený poměr třídy 2:1 avermektinů ve srovnání s buňkami stejného kmene *S. avermitilis*, které exprimují pouze divoký typ *aveC* alely, dále zahrnující transformující buňky kmene *S. avermitilis* s vektorem, který nese mutovanou *aveC* alelu kódující genový produkt, který narušuje poměr třídy 2:1 avermektinů produkovaných buňkami kmene *S. avermitilis*, které exprimují mutovaný typ *aveC* alely ve srovnání s buňkami stejného kmene *S. avermitilis*, které exprimují pouze divoký typ *aveC* alely, a dále výběr transformovaných buněk, které produkují avermektiny v narušeném poměru třídy 2:1 avermektinů ve srovnání s poměrem třídy 2:1 produkovaným buňkami kmene *S.*

avermitilis, které exprimují pouze divoký typ aveC alely. V přednostní formě vynálezu je snížen poměr třídy 2:1 avermektinů produkovaných v buňkách nového kmene.

V další přednostní formě poskytuje předkládaný vynález způsoby přípravy nových kmenů *S. avermitilis* zahrnující buňky, které produkují narušená množství avermektinů, zahrnující transformující buňky kmene *S. avermitilis* s vektorem, který nese mutovanou aveC alelu nebo genetický konstrukt obsahující aveC alelu, jejichž exprese vede k narušenému množství avermektinů produkovaných buňkami kmene *S. avermitilis*, které exprimují mutovanou aveC alelu nebo genetický konstrukt ve srovnání s buňkami stejného kmene *S. avermitilis*, které exprimují pouze divoký typ aveC alely, a dále zahrnující výběr transformovaných buněk, které produkují avermektiny v narušeném množství ve srovnání s množstvím avermektinů produkovaných buňkami kmene *S. avermitilis*, které exprimují pouze divoký typ aveC alely. V přednostní formě vynálezu je množství avermektinů produkovaných v buňkách nového kmene zvýšeno.

V další přednostní formě poskytuje předkládaný vynález způsoby přípravy nových kmenů *S. avermitilis*, jejichž buňky obsahují inaktivovanou aveC alelu, obsahující transformující buňky kmene *S. avermitilis*, které exprimují jakoukoli aveC alelu s vektorem, který inaktivuje aveC alelu a dále výběr transformovaných buněk, v kterých byla aveC alela inaktivována.

Předkládaný vynález dále poskytuje nové kmeny *S. avermitilis*, které byly transformovány jakoukoli polynukleotidovou molekulou nebo vektory obsahujícími mutované nukleotidové sekvence, které jsou předmětem předkládaného vynálezu. V přednostní formě poskytuje předkládaný vynález nové kmeny *S.*

avermitilis zahrnující buňky, které exprimují mutovanou aveC alelu na místo nebo navíc k divokému typu aveC alely, kde buňky nového kmene produkují avermektiny v narušeném poměru třídy 2:1 ve srovnání s buňkami stejného kmene S. avermitilis, které exprimují pouze divoký typ aveC alely. V přednostnější formě vynálezu produkuje nový kmen avermektiny v narušeném poměru třídy 2:1 ve srovnání s buňkami stejného kmene S. avermitilis, které exprimují pouze divoký typ aveC alely. Takové nové kmeny jsou užitečné k produkci komerčně žádoucích avermektinů, jako je například doramektin, ve velkém měřítku.

V další přednostní formě vynálezu poskytuje předkládaný vynález nové kmeny S. avermitilis, které exprimují mutovanou aveC alelu nebo genetický konstrukt obsahující aveC alelu na místo nebo navíc k nativní aveC alele, což vede k buněčné produkci narušeného množství avermektinů ve srovnání s množstvím avermektinů produkovaných buňkami stejného kmene S. avermitilis, které exprimují pouze divoký typ aveC alely. V přednostní formě vynálezu produkují nové buňky zvýšené množství avermektinů.

V další přednostní formě vynálezu poskytuje předkládaný vynález nové kmeny S. avermitilis obsahující buňky, v kterých byl aveC gen inaktivován. Takové kmeny jsou užitečné pro různé spektrum avermektinů, které tyto buňky produkují ve srovnání s divokým kmenem, i pro komplementaci vyhledávacích analýz, jak jsou zde popsány, aby se určilo, zdali cílená nebo náhodná mutagenese aveC genu ovlivňuje produkci avermektinů.

Předkládaný vynález dále poskytuje postup produkce avermektinů zahrnující kultivaci buněk kmene S. avermitilis, kteréžto buňky exprimují mutovanou aveC alelu, která kóduje genový produkt, který alteruje poměr třídy 2:1 avermektinů produkovaných buňkami kmene S. avermitilis exprimujícími

mutovanou aveC alelu ve srovnání s buňkami stejného kmene *S. avermitilis*, které exprimují pouze divoký typ aveC alely v kultivačním médiu za podmínek, které z nich umožňují nebo indukují produkci avermektinů, a získání řečených avermektinů z kultury. V přednostní formě vynálezu je snížen poměr třídy 2:1 avermektinů produkovaných buňkami exprimujícími mutaci. Postup poskytuje zvýšenou účinnost produkce komerčně hodnotných avermektinů, jako je například doramectin.

Předkládaný vynález dále poskytuje postup produkce avermektinů zahrnující kultivaci buněk kmene *S. avermitilis*, kteréžto buňky exprimují mutovanou aveC alelu nebo genetický konstrukt obsahující aveC alelu, které vedou k narušenému množství avermektinů produkovaných buňkami kmene *S. avermitilis* exprimujícími mutovanou aveC alelu nebo genetický konstrukt ve srovnání s buňkami stejného kmene *S. avermitilis*, které neexprimují pouze mutovanou aveC alelu nebo genetický konstrukt, ale místo toho exprimují pouze divoký typ aveC alely, v kultivačním médiu za podmínek, které z nich umožňují nebo indukují produkci avermektinů, a kterýžto způsob zahrnuje dále získání řečených avermektinů z kultury. V přednostní formě vynálezu je zvýšeno množství avermektinů produkovaných buňkami exprimujícími mutaci nebo genetický konstrukt.

Předkládaný vynález dále poskytuje nové složení avermektinů produkované kmenem *S. avermitilis* exprimujícím mutovanou aveC alelu, která je předmětem předkládaného vynálezu, kde avermektiny jsou produkovány ve sníženém poměru třídy 2:1 ve srovnání poměrem 2:1 třídy avermektinů produkovaných buňkami stejného kmene *S. avermitilis*, které neexprimují mutovanou aveC alelu, ale místo toho exprimují pouze divoký typ aveC alely. Nové složení avermektinů může být přítomno, jak je produkováno ve fermentační kultivační tekutině, nebo z ní může staženo nebo může být z ní významně purifikováno.

4. Stručný popis obrázků

Obrázek 1. DNA sekvence (SEQ ID č. 1) obsahující aveC ORF *S. avermitilis* a odvozenou aminokyselinovou sekvenci (SEQ ID č. 2).

Obrázek 2. Plazmidový vektor pSE186 (ATCC 209604) obsahující celý ORF aveC genu *S. avermitilis*.

Obrázek 3. Gen nahrazující vektor pSE180 (ATCC 209605) obsahující ermE gen *Sacc. erythraea* inzerovaný do aveC ORF *S. avermitilis*.

Obrázek 4. BamHI restriční mapa shluků genů pro avermektin polyketid syntázu ze *S. avermitilis* s identifikovanými pěti přesahujícími kosmidovými klony (tj. pSE65, pSE 66, pSE67, pSE68, pSE69). Uveden je také vztah pSE118 a PSE119.

Obrázek 5. HPLC analýza fermentačních produktů produkovaných kmeny *S. avermitilis*. Kvantifikace vrcholu byla provedena srovnáním množství standard cyklohexylu B1. Retenční čas cyklohexylu B2 byl 7,4-7,7 minuty, retenční čas cyklohexylu B1 byl 11,9-12,3 minuty. Obrázek 5A. Kmen *S. avermitilis* SE180-11 s inaktivovaným aveC ORF. Obr. 5B. Kmen *S. avermitilis* SE180-11 transformovaný pomocí pSE187. Obr. 5D. Kmen *S. avermitilis* SE180-11 transformovaný pomocí pSE188.

Obrázek 6. Srovnání vyvozených aminokyselinových sekvencí kódovaných aveC ORF *S. avermitilis* (SEQ ID č.2), aveC homologním částečným ORF z *S. griseochromogenes* (SEQ ID č.5), a aveC homologním ORF z *S. hygroscopicus* (SEQ ID č.4). Valinové reziduum označené tučně je domnělé startovací místo pro bílkovinu. Konzervovaná rezidua jsou uvedena velkými písmeny pro homologii ve všech třech sekvencích a malými

písmeny pro homologii ve dvou ze tří sekvencí. Aminokyselinové sekvence mají přibližně 50% identitu sekvencí.

Obrázek 7. Hybridní plazmidový konstrukt obsahující 564 bp BsaAI/KpnI fragment z *S. hygroscopicus* *aveC* homologního genu inzerovaného do BaaAI/KpnI místa v *S. avermitilis* *aveC* ORF.

5. Detailní popis vynálezu

Předkládaný vynález se týká identifikace a charakterizace polynukleotidových molekul majících nukleotidové sekvence, které kódují *aveC* genový produkt ze *Streptomyces avermitilis*, konstrukce nových kmenů *S. avermitilis*, které mohou být použity k vyhledávání mutovaných *AveC* genových produktů pro jejich efekt na produkci avermektinů, a objevu, že určité mutované *AveC* genové produkty mohou snižovat poměr B2:B1 avermektinů produkovaných *S. avermitilis*. Vynález je popsán příkladem v částech uvedených níže jako polynukleotidová molekula mající buďto nukleotidovou sekvenci, která je stejná jako pro *S. avermitilis* *AveC* genový produkt-kódující sekvenci plazmidu pSE186 (ATCC 209604) nebo nukleotidovou sekvenci ORF uvedenou na Obrázku 1 (SEQ ID č.1), a polynukleotidové molekuly mající z nich odvozené mutované nukleotidové sekvence a jejich degenerované varianty. Principy uvedené v předkládaném vynálezu však mohou být analogicky aplikovány na další polynukleotidové molekuly, včetně *aveC* homologních genů z jiných druhů *Streptomyces*, zahrnující mezi jinými například *S. hygroscopicus* a *S. griseochromogenes*.

5.1. Polynukleotidové molekuly kódující *S. avermitilis* *AveC* genový produkt

Předkládaný vynález poskytuje izolovanou polynukleotidovou molekulu obsahující kompletní *aveC* ORF *S. avermitilis* nebo jeho významnou část, kterážto izolovaná polynukleotidová

molekula postrádá další kompletní ORF, který je lokalizován směrem dolů od ORF in situ na chromozómu *S. avermitilis*.

Izolovaná polynukleotidová molekula, která je předmětem předkládaného vynálezu obsahuje přednostně nukleotidovou sekvenci, která je stejná, jako je *S. avermitilis* AveC genový produkt kódující sekvenci plazmidu pSE186 (ATCC 209604), nebo je stejná jako nukleotidová sekvence ORF z Obrázku 1 (SEQ ID č.1), nebo její významná část. Jak je zde použito, "významná část" izolované polynukleotidové molekuly obsahující nukleotidovou kódující *S. avermitilis* AveC genový produkt znamená izolovanou polynukleotidovou molekulu obsahující alespoň 70% kompletní aveC ORF sekvence uvedené na Obrázku 1 (SEQ ID č.1), který kóduje funkčně ekvivalentní AveC genový produkt. V tomto ohledu je "funkčně ekvivalentní" AveC genový produkt definován jako genový produkt, který je-li exprimován v kmeni *S. avermitilis* ATCC 53692, v kterém byla nativní aveC alela inaktivována, vede k produkci významně stejného poměru a množství avermektinů, jako je produkováno kmenem *S. avermitilis* ATCC 53692, který exprimuje pouze divokou, funkční aveC alelu nativní pro kmen *S. avermitilis* ATCC 53692.

Navíc k nukleotidové sekveci aveC ORF může izolovaná polynukleotidová molekula, která je předmětem předkládaného vynálezu, dále obsahovat nukleotidové sekvence, které přirozeně hraničí s aveC genem in situ v *S. avermitilis*, jako jsou například hraničící nukleotidové sekvence uvedené na Obrázku 1 (SEQ ID č. 1).

Předkládaný vynález dále poskytuje izolovanou polynukleotidovou molekulu obsahující nukleotidovou sekvenci SEQ ID č. 1, nebo její degenerovanou variantu.

Jak je zde používáno, týkají se termíny "polynukleotidová molekula", "polynukleotidová sekvence", "kódující sekvence", "otevřený čtecí rámec" a "ORF", DNA i RNA molekul, které mohou být buďto jednovláknové nebo dvouvláknové, a které mohou být transkribované nebo translatované (DNA), nebo translatované (RNA) do AveC genového produktu, nebo do polypeptidu, který je homologní s AveC genovým produktem nebo s AveC homologním genovým produktem v příslušném expresním systému hostitelské buňky, je-li pod kontrolou příslušných regulačních elementů. Kódující sekvence může zahrnovat, ale není omezena na prokaryotické sekvence, cDNA sekvence, genomické DNA sekvence a chemicky syntetizované DNA a RNA sekvence.

Nukleotidová sekvence uvedená na Obrázku 1 (SEQ ID č. 1) zahrnuje čtyři odlišné GTG kodóny v pozicích bp 42, 174, 177 a 180. Jak je uvedeno níže byly konstruovány mnohočetné delece 5'- oblasti aveC ORF (Obrázek 1, SEQ ID č. 1), aby se pomohlo definovat, který z těchto kodónů by mohl fungovat v aveC ORF jako starovací místo pro expresi bílkovin. Delece prvního GTG místa v pozici 42 bp neeliminovalo AveC aktivitu. Další delece všech GTG kodónů v pozicích 174, 177 a 180 bp společně eliminovaly AveC aktivitu, což ukazuje, že tato oblast je nezbytná pro expresi bílkovin. Předkládaný vynález tedy zahrnuje aveC ORF o variabilní délce.

Předkládaný vynález dále poskytuje polynukleotidovou molekulu mající nukleotidovou sekvenci, která je homologní s *S. avermitilis* AveC genový produkt-kódující sekvencí plazmidu pSE186 (ATC 209604), nebo s nukleotidovou sekvencí aveC ORF prezentovanou na Obrázku 1 (SEQ ID č. 1) nebo s její významnou částí. Termín "homologní", je-li použit ve vztahu k polynukleotidové molekule, která je homologní s *S. avermitilis* AveC genový produkt-kódující sekvencí, znamená polynukleotidovou molekulu mající nukleotidovou sekvenci: a)

která kóduje stejný AveC genový produkt jako *S. avermitilis* genový produkt-kódující sekvenci plazmidu pSE186 (ATCC 209604), nebo která kóduje stejný AveC genový produkt, jako je nukleotidová sekvence aveC ORF prezentovaná na Obrázku 1 (SEQ ID č. 1), ale která zahrnuje jednu nebo více němých změn nukleotidové sekvence podle degenerace genetického kódu (tj. degenerační varianta); nebo b) která hybridizuje, aby zkomplementovala polynukleotidovou molekulu mající nukleotidovou sekvenci, která kóduje AveC genový produkt-kódující sekvenci plazmidu pSE186 (ATCC 209604), nebo která kóduje aminokyselinovou sekvenci uvedenou na Obrázku 1 (SEQ ID č. 2) za mírně přísných podmínek, tj. hybridizace k odfiltrování navázané DNA v 0,5 M NaHPO₄, 7% sodném dodecylsulfátu (SDS), 1 mM EDTA při teplotě 65°C, a promytí v 0,2 x SSC/0,1% SDS při teplotě 42°C (viz Ausubel et al. (eds), 1989, Current Protocols in Molecular Biology, Sv. I, Green Publishing Associates, Inc, a John Wiley and Sons, Inc, New York, strana 2.10.3), která kóduje funkčně ekvivalentní AveC genový produkt, jak je definováno výše. V přednostní formě hybridizuje homologní polynukleotidová molekula, aby zkomplementovala AveC genový produkt-kódující sekvenci plazmidu pSE186 (ATCC 209604), nebo zkomplementovala nukleotidovou sekvenci aveC ORF prezentovanou na Obrázku 1 (SEQ ID č. 1), nebo její významnou část za vysoce přísných podmínek tj. hybridizace k odfiltrování navázané DNA v 0,5 M NaHPO₄, 7% SDS, 1 mM EDTA při teplotě 65°C, a promytí v 0,1 x SSC/0,1% SDS při teplotě 68°C (viz Ausubel et al., 1989, výše), která kóduje funkčně ekvivalentní AveC genový produkt, jak je definováno výše.

Aktivita AveC genového produktu a jeho potenciálně funkčních ekvivalentů může být určena HPLC analýzou fermentačních produktů, jak je popsáno v příkladech provedení vynálezu níže. Polynukleotidové molekuly mající nukleotidové sekvence, které

kódují funkční ekvivalenty *S. avermitilis* AveC genového produktu, zahrnují přirozeně se vyskytující se aveC geny přítomné v jiných kmenech *S. avermitilis*, aveC homologní geny přítomné v jiných druzích *Streptomyces*, a mutované aveC alely přirozeně se vyskytující se nebo připravené genetickým inženýrstvím.

Předkládaný vynález dále poskytuje polynukleotidovou molekulu obsahující nukleotidovou sekvenci, která kóduje polypeptid mající aminokyselinovou sekvenci, která je homologní s aminokyselinovou sekvencí kódovanou AveC genový produkt-kódující sekvencí plazmidu pSE186 (ATCC 209604), nebo aminokyselinovou sekvencí z Obrázku 1 (SEQ ID č. 2) nebo s její významnou částí. Jak je zde použito, znamená "významná část" aminokyselinové sekvence z Obrázku 1 (SEQ ID č. 2) polypeptid obsahující okolo 70% aminokyselinové sekvence uvedené na Obrázku 1 (SEQ ID č. 2), která konstituuje funkčně ekvivalentní AveC genový produkt, jak je definováno výše.

Jak je zde používáno s odkazem na aminokyselinové sekvence, které jsou homologní s aminokyselinovými sekvencemi AveC genového produktu *S. avermitilis*, týká se termín "homologní" polypeptidu, který má jinak aminokyselinovou sekvenci uvedenou na Obrázku 1 (SEQ ID č. 2), ale v kterém jedno nebo více aminokyselinových reziduí je konzervativně substituováno odlišným aminokyselinovým reziduem, kde řečená aminokyselinová sekvence má alespoň zhruba 70%, přednostněji alespoň zhruba 80%, a nejvýhodněji alespoň zhruba 90% identity aminokyselinové sekvence s polypeptidem kódovaným AveC genový produkt-kódující sekvencí plazmidu pSE186 (ATCC 209604) aminokyselinové sekvence z Obrázku 1 (SEQ ID č. 2), jak je určeno jakýmkoli standardním algoritmem identity aminokyselinových sekvencí, jako je například algoritmus BLASTP (GENBANK, NCBI), a kde taková konzervativní substituce

vede ke vzniku funkčně ekvivalentního genového produktu, jak je definováno výše. Konzervativní aminokyselinové substituce jsou dobře známy v oboru. Pravidla pro provádění takových substitucí zahrnují pravidla popsaná mezi jinými Dayhofem MD, 1978, Nat Biomed Res Found, Washington, DC, sv. 5, Sup. 3. Konzervativní aminokyselinové substituce jsou specifitější ty substituce, které se obecně uskutečňují v rámci rodiny aminokyselin, které jsou příbuzné aciditou nebo polaritou. Geneticky kódované aminokyseliny jsou obecně rozděleny do čtyřech skupin: 1) kyselé = aspartát, glutamát; 2) báze = lysin, arginin, histidin; 3) nepolární = alanin, valin, leucin, izoleucin, prolin, fenylalanin, methionin, tryptofan; a 4) polární bez náboje = glycin, asparigin, glutamin, cystein, serin, threonin, tyrosin. Fenylalanin, tryptofan, tyrosin jsou také společně klasifikovány jako aromatické aminokyseliny. Jedna nebo více náhrad v jakékoli konkrétní skupině, například náhrada leucinu za izoleucin nebo valin, nebo aspartátu za glutamát, nebo threonin za serin, nebo za jakékoli jiné aminokyselinové reziduum se strukturálně příbuzným aminokyselinovým reziduem, například aminokyselinové reziduum s podobnou aciditou nebo polaritou, nebo podobných v kombinaci těchto vlastností, budou mít obecně nevýznamný efekt na funkci polypeptidu.

Předkládaný vynález dále poskytuje izolovanou polynukleotidovou molekulu obsahující nukleotidovou sekvenci kódující AveC homologní genový produkt. Jak je zde používáno, je "AveC homologní genový produkt" definován jako genový produkt mající alespoň zhruba 50% aminokyselinovou sekvenci identitu s AveC genovým produktem *S. avermitilis* obsahujícím aminokyselinovou sekvenci kódovanou AveC genový produkt-kódující sekvencí plazmidu pSE186 (ATCC 209604), nebo aminokyselinové sekvence uvedené na Obrázku 1 (SEQ ID č. 2), jak je určeno jakýmkoli standardním algoritmem identity

aminokyselinových sekvencí, jako je například algoritmus BLASTP (GENBANK, NCBI). V neomezuující formě vynálezu je AveC homologní genový produkt ze *S. hygroscopicus* (popsaný v přihlášce EP 0298423; depozit FERM BP-1901) a obsahuje aminokyselinovou sekvenci SEQ ID č.:4 nebo její významnou část. "Významná část" aminokyselinové sekvence SEQ ID NO:4 znamená polypeptid obsahující alespoň 70% aminokyselinové sekvence SEQ ID NO:4, a který konstituuje funkčně ekvivalentní AveC homologní genový produkt. "Funkčně ekvivalentní" AveC homologní genový produkt je definován jako genový produkt, který je-li exprimován v kmeni *S. hygroscopicus* FERM BP-1901, v kterém byla nativní aveC homologní alela inaktivována, vede k produkci významně stejného poměru a množství milbemycinů, jako jsou produkovány kmenem *S. hygroscopicus* FERM BP-1901 exprimujícím místo divokého typu funkční aveC homologní alelu nativní kmeni *S. hygroscopicus* FERM BP-1901. V neomezuující formě vynálezu obsahuje izolovaná polynukleotidová molekula, která je předmětem předkládaného vynálezu, a která kóduje *S. hygroscopicus* AveC homologní genový produkt, nukleotidovou sekvenci SEQ ID č.3 nebo její významnou část. V tomto ohledu znamená "významná část" izolované polynukleotidové molekuly obsahující nukleotidovou sekvenci SEQ ID č.3 izolovanou polynukleotidovou molekulu obsahující alespoň 70% nukleotidové sekvence SEQ ID č.3, která kóduje funkčně ekvivalentní AveC homologní genový produkt, jak je definováno výše.

Předkládaný vynález dále poskytuje polynukleotidovou molekulu obsahující nukleotidovou sekvenci, která je homologní s *S. hygroscopicus* nukleotidovou sekvencí SEQ ID č. 3. Termín "homologní", je-li použit k odkazu na polynukleotidovou molekulu obsahující nukleotidovou sekvenci, která je homologní s *S. hygroscopicus* AveC homologní genový produkt-kódující sekvencí SEQ ID č.3, znamená polynukleotidovou molekulu mající nukleotidovou sekvenci: a) která kóduje stejný genový produkt,

jako je nukleotidová sekvence SEQ ID č.3, ale která obsahuje jednu nebo více němých změn v nukleotidové sekvenci podle degenerace genetického kódu (tj. degenerovaná varianta); nebo b) která hybridizuje, aby komplementovala polynukleotidovou molekulu mající nukleotidovou sekvenci, která kóduje aminokyselinovou sekvenci SEQ ID č.4 za mírně přísných podmínek, tj. hybridizace k odfiltrování navázané DNA v 0,5 M NaHPO₄, 7% SDS, 1 mM EDTA při teplotě 65°C, a promytí v 0,2 x SSC/0,1% SDS při teplotě 42°C (viz Ausubel et al. viz výše), která kóduje funkčně ekvivalentní AveC homologní genový produkt, jak je definováno výše. V přednostní formě vynálezu hybridizuje homologní polynukleotidová molekula, aby zkomplementovala AveC genový produkt-kódující nukleotidovou sekvenci SEQ ID č.3 za vysoce přísných podmínek tj. hybridizace k odfiltrování navázané DNA v 0,5 M NaHPO₄, 7% SDS, 1 mM EDTA při teplotě 65°C, a promytí v 0,1 x SSC/0,1% SDS při teplotě 68°C (viz Ausubel et al., 1989, výše), která kóduje funkčně ekvivalentní AveC genový produkt, jak je definováno výše.

Předkládaný vynález dále poskytuje polynukleotidovou molekulu obsahující nukleotidovou sekvenci, která kóduje polypeptid, který je homologní s *S. hygroscopicus* AveC homologním genovým produktem. Jak je zde používáno, týká se termín "homologní" s odkazem na polypeptidy, které jsou homologní s AveC homologním genovým produktem se sekvencí SEQ ID č.4 ze *S. hygroscopicus*, polypeptidu, který má jinak aminokyselinovou sekvenci SEQ ID č.4, ale v které jedno nebo více aminokyselinových reziduí bylo konzervativně substituováno odlišným aminokyselinovým reziduem, jak je definováno výše, kde řečená aminokyselinová sekvence má alespoň 70%, přednostněji alespoň 80%, nejvýše 90% aminokyselinovou sekvenci identitu k polypeptidu o sekvenci SEQ ID č.4, jak je určeno jakýmkoli standardním algoritmem

aminokyselinové sekvenční identity, jako je například algoritmus BLASTP (GENBANK), NCBI), kde taková konzervativní substituce vede k funkčně ekvivalentnímu AveC homolognímu genovému produktu, jak je definováno výše.

Předkládaný vynález dále poskytuje oligonukleotidy, které hybridizují s polynukleotidovou molekulou mající nukleotidovou sekvenci uvedenou na Obrázku 1 (SEQ ID č. 1) nebo SEQ ID č. 3, nebo polynukleotidovou molekulu mající nukleotidovou sekvenci, která je komplementární nukleotidové sekvenci uvedené na Obrázku 1 (SEQ ID č.1) nebo SEQ ID č. 3. Takové oligonukleotidy mají alespoň 10 nukleotidů, přednostně od zhruba 15 do zhruba 30 nukleotidů, a hybridizují s jednou s výše uvedených polynukleotidových molekul za vysoce přísných podmínek tj. promytí v 6 x SSC/0,5% pyrofosfátu sodném při teplotě zhruba 37°C pro oligonukleotidy o zhruba 14 bázích, při teplotě zhruba 48°C pro oligonukleotidy o zhruba 17 bázích, při teplotě zhruba 55°C pro oligonukleotidy o zhruba 20 bázích, a při teplotě zhruba 60°C pro oligonukleotidy o zhruba 23 bázích. V přednostní formě vynálezu jsou oligonukleotidy komplementární k části jedné z výše zmíněných polynukleotidových molekul. Tyto oligonukleotidy jsou užitečné pro celou řadu účelů včetně kódování nebo účinkování jako antisense molekuly pro regulaci genů, nebo jako primery pro amplifikaci aveC nebo aveC homolog-kódujících polynukleotidových molekul.

Další aveC homologní geny mohou být identifikovány u jiných druhů nebo kmenů *Strptomyces* za použití polynukleotidových molekul nebo oligonukleotidů uvedených zde ve spojení se známými technikami. Například oligonukleotidová molekula obsahující část *S. avermitilis* nukleotidové sekvence z Obrázku 1 (SEQ ID č.1), nebo část *S. avermitilis* nukleotidové sekvence SEQ ID č.3 může být detekovatelně označena a použita

k vyhledávání genomické knihovny konstruované z DNA odvozené z organismu, který je předmětem zájmu. Přísnost hybridizačních podmínek je zvolena na základě vztahu referenčního organismu, v tomto případě *S. avermitilis* nebo *S. hygroscopicus*, k organismu, který je předmětem zájmu. Požadavky na různě přísné podmínky jsou dobře známy osobám zkušeným oboru, a tyto podmínky se liší v závislosti na specifických organismech, z nichž jsou knihovna a označené sekvence odvozeny. Takové oligonukleotidy mají přednostně alespoň zhruba 15 nukleotidů, například se jedná o oligonukleotidy popsané v příkladech provedení vynálezu níže. Amplifikace homologních genů může být provedena za použití těchto i jiných oligonukleotidů použitím standardních technik, jako je například polymerázová řetězová reakce (PCR), ačkoli mohou být použity i jiné amplifikační techniky známé v oboru.

Klony identifikované jako obsahující *aveC* homologní nukleotidové sekvence mohou být testovány na schopnost kódovat funkční *AveC* homologní genový produkt. Pro tento účel mohou být klony podrobeny sekvenční analýze za účelem identifikace vhodného čtecího rámce, stejně tak jako iniciačních a terminačních signálů. Klonované DNA sekvence mohou být alternativně nebo navíc inzerovány do vhodného expresního vektoru, tj. do vektoru, který obsahuje nezbytné elementy pro transkripci a translaci inzerované protein-kódující sekvence. Může být použit jakýkoli z celé řady hostitelských/vektorových systémů, jak je popsáno níže, které zahrnují, ale nejsou omezeny na bakteriální systémy, jako jsou například plazmidové, bakteriofágové nebo kosmidové expresní vektory. Příslušné hostitelské buňky transformované takovými vektory zahrnující potenciální *aveC* homolog-kódující sekvence mohou být poté analyzovány na aktivitu *AveC* za použití způsobů, jako je například HPLC analýza fermentačních produktů, jak je popsáno například v Části 7 níže.

Produkce a manipulace polynukleotidových molekul zde uvedených jsou známy v oboru a mohou být provedeny podle rekombinantních technik popsaných například v Maniatis et al., 1989, Molecular Cloning, A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY; Ausubel et al., 1989, Current Protocols In Molecular Biology, Greene Publishing Associates and Wiley Interscience, NY; Sambrook et al., 1989, Molecular Cloning, A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY; Innis et al. (eds), 1995, PCR strategies, Academic Press, Inc., San Diego; a Erlich (ed), 1992, PCR Technology, Oxford University Press, New York, kteréžto publikace jsou všechny do vynálezu začleněny jako reference. Polynukleotidové klony kódující AveC genové produkty nebo AveC homologní genové produkty, mohou být identifikovány za pomoci metod známých v oboru, které zahrnují, ale nejsou omezeny na způsoby uvedené v Části 7 níže. Genomické knihovny mohou být vyhledávány na aveC a aveC homologní kódující sekvenční za použití technik, jako jsou například metody uvedené v publikaci Benton a Davis, 1977, Science 196:180 pro bakterifágové knihovny, a v publikaci Grunstein a Hodness, 1975, Proc Natl Acad sci USA, 72: 3961-3965 pro plazmidové knihovny. Polynukleotidové molekuly mající nukleotidové sekvenční, o kterých je známo, že zahrnují aveC ORF jako takový, například v plazmidu pSE186 (ATCC 209604) nebo v plazmidu pSE119 (popsáno v Části 7 níže), mohou být použity jako próby v těchto vyhledávacích experimentech. Oligonukleotidové próby mohou být syntetizovány alternativně tak, že korespondují s nukleotidovými sekvencemi odvozenými od částečných nebo úplných aminokyselinových sekvencí purifikovaného AveC homologního genového produktu.

5.2 Rekombinantní systémy

5.2.1 Klonovací a expresní vektory

Předkládaný vynález dále poskytuje rekombinantní klonovací vektory a expresní vektory, které jsou užitečné pro klonování nebo exprimování polynukleotidových molekul, které jsou předmětem předkládaného vynálezu, například *aveC* ORF *S. avermitilis* nebo jakýchkoli *aveC* homologních ORF. V nelimitující formě poskytuje předkládaný vynález plazmid pSE186 (ATCC 209604), který obsahuje kompletní ORF *aveC* gen *S. avermitilis*.

Všechny z následujících popisů týkajících se *aveC* ORF z *S. avermitilis*, nebo polynukleotidové molekuly obsahující *aveC* ORF z *S. avermitilis*, nebo její část, nebo *S. avermitilis* *AveC* genový produkt, se také týkají *aveC* homolog a *AveC* homologních genových produktů, ledaže je výslovně nebo z kontextu uvedeno jinak.

Pro specifické použití u *Streptomyces* byla použita celá řada různých vektorů, zahrnujících mezi jinými vektory fágové, plazmidy s vysokým počtem kopií, plazmidy s nízkým počtem kopií a *E. coli*-*Streptomyces* přenosové vektory, a jakýkoli z nich může být použit k provedení předkládaného vynálezu. Ze *Streptomyces* byla také klonována celá řada genů pro lékovou rezistenci a některé z těchto genů byly začleněny do vektorů jako vektory, které je možno zvolit. Příklady běžných vektorů pro použití v *Streptomyces* jsou prezentovány mezi jinými místy v publikaci Hutchinson 1980, *Applied Biochem Biotech* 16:169-190.

Rekombinantní vektory, které jsou předmětem předkládaného vynálezu, obzvláště expresní vektory, jsou přednostně konstruovány tak, že kódující sekvence polynukleotidové

molekuly, která je předmětem vynálezu, je v operačním spojení s jedním nebo více regulačních elementů nezbytných pro transkripci a translaci kódující sekvence za účelem produkce polypeptidu. Jak je zde používáno, termín "regulační element" zahrnuje, ale není omezen na nukleotidové sekvence, které kódují induktibilní a neinduktibilní promotory, enhancery a další elementy známé v oboru, které slouží k regulaci exprese polynukleotid-kódujících sekvencí. Jak je zde také použito, je kódující sekvence v "operačním spojení" s jedním nebo více regulačních elementů, kde regulační elementy účinně regulují a umožňují transkripci kódující sekvence nebo translaci jeho mRNA, či obojí.

Typické plazmidové vektory, které mohou být připraveny, aby obsahovaly mezi mnoha jinými pCR-Blunt, pCR2.1 (Invitrogen), pGEM3Zf (Promega) a transportní vektor pWHM3 (Vara et al., 1989, J. Bact. 171:5872-5881).

Způsoby pro konstrukci rekombinantních vektorů obsahující konkrétní kódující sekvence v operačním spojení s příslušnými regulačními elementy jsou dobře známy v oboru, a tyto způsoby mohou být použity k provedení předkládaného vynálezu. Tyto způsoby zahrnují in vitro rekombinantní techniky, syntetické techniky a in vivo genetickou rekombinaci. Viz například techniky popsané v publikaci Maniatis et al., 1989, výše; Ausubel et al., 1989, výše; Sambrook et al., 1989, výše; Innis et al., 1995, výše; Erlich 1992, výše.

Regulační elementy těchto vektorů se mohou lišit ve své síle ve svých specifitách. V závislosti na použitém hostitelském/vektorovém systému může být použito jakékoli množství vhodných transkripčních a translačních elementů. Neomezující příklady transkripčních regulačních oblastí nebo promotorů pro bakterie β -gal promotor, T7 promotor, TAC

promotor, λ levý a pravý promotor, trp a lac promotory, trp-lac fúzní promotory a specifičtější pro *Streptomyces*, promotory ermE, melC a tipA, atd. Ve specifické formě popsané v Části 11 níže byl generován expresní vektor, který obsahuje klonovaný aveC ORF přilehle k silnému konstitutivnímu ermE promotoru ze *Sacharopolyspora erythraea*. Vektor byl transformován do *S. avermitilis* a následná HPLC analýza fermentačních produktů ukázala zvýšený titr produkovaných avermektinů ve srovnání s produkcí stejného kmene, který ale exprimuje divoký typ aveC alely.

Fúzní proteinové expresní vektory mohou být použity k expresi AveC genový produkt-fúzního proteinu. Purifikovaný fúzní protein může být použit k získání antiséra proti AveC genovému produktu, ke studiu biochemických vlastností AveC genového produktu, k přípravě AveC fúzních proteinů s odlišnými biochemickými aktivitami a k pomoci identifikovat nebo purifikovat exprimovaný AveC genový produkt. Možné expresní vektory pro fúzní protein zahrnují, ale nejsou omezeny na vektory inkorporující sekvence, které kódují β -galaktosidázu a trpE fúze, maltózu vázající proteinové fúze, glutathion-S-transferázové fúze a polyhistidinové fúze (nosičové oblasti). V alternativní formě vynálezu mohou být AveC genový produkt nebo jeho část zfúzovány s AveC homologním genovým produktem nebo jeho částí, odvozené od jiných druhů nebo kmene *Streptomyces*, jako jsou například *S. hygroscopicus* nebo *S. griseochromogenes*. V konkrétní formě vynálezu popsané v Části 12 níže a zobrazené na Obrázku 7 byl zkonstruován chimérický plazmid. Který obsahuje 564 bp oblast *S. avermitilis* aveC ORF. Takové hybridní vektory mohou být transformovány do buněk *S. avermitilis* a testovány za účelem určení jejich efektu například na poměr třídy 2:1 produkovaných avermektinů.

AveC fúzní proteiny mohou být připraveny, aby obsahovaly oblast užitečnou pro purifikaci. Fúzní AveC-maltózu vázající protein může být například purifikován za použití amylázové pryskyřice; fúzní proteiny AveC-glutathion-S-tranferáza mohou být purifikovány za použití glutathion-agarózy; fúzní proteiny AveC-polyhistidin mohou být purifikovány za použití pryskyřice s bivalentním niklem. Pro purifikaci fúzního proteinu afinitní chromatografií mohou být alternativně použity protilátky proti nosičovému proteinu nebo peptidu. Například nukleotidová sekvence kódující cílový epitop monoklonální protilátky může být připravena do expresního vektoru v operačním spojení s regulačními elementy a situována tak, že exprimovaný epitop je zfúzován do AveC polypeptidu. Například nukleotidová sekvence kódující FLAGTM epitopovou návěšt' (International Biotechnologies Inc.), což je hydrofilní markerový peptid, může být inzertován standardními technikami do expresního vektoru v bodě odpovídajícím například karboxylovému konci AveC polypeptidu. Exprimovaný AveC polypeptid-FLAGTM epitop fúzní produkt může být poté detekován a afinitně purifikován za použití komerčně dostupných anti-FLAGTM protilátek.

Expresní faktor kódující AveC fúzní protein může být také připraven, aby obsahoval polyspojovací sekvence kódující specifická proteázová štěpící místa tak, že exprimovaný AveC polypeptid může být uvolněn z nosičové oblasti nebo z fúzního partnera pomocí specifické proteázy. Fúzní proteinový vektor může například zahrnovat DNA sekvence kódující mezi jinými trombin nebo faktor Xa štěpící místa.

Signální sekvence nahoru od, a ve čtecím rámci aveC ORF může být vpravena do expresního vektoru známými způsoby, aby se usměrnil směr a sekrece exprimovaného genového produktu. Neomezující příklady signálních sekvencí zahrnují mezi jinými

sekvence α -faktoru, imunoglobulinů, vnějších membránových proteinů, penicilinázy a T buněčných receptorů.

K pomoci při výběru hostitelských buněk transformovaných nebo transfektovaných klonovacími nebo expresními vektory, které jsou předmětem předkládaného vynálezu může být vektor připraven tak, že dále obsahuje kódující sekvenci pro reportérový genový produkt nebo jiný volitelný marker. Taková kódující sekvence je přednostně v operačním spojení se sekvencemi kódujícími regulační element, jak je popsáno výše. Reportérové geny, které jsou užitečné ve vynálezu, jsou dobře známé v oboru a zahrnují geny kódující mezi jinými zelený fluorescenční protein luciferázu, xylE a tyrosinázu. Nukleotidové sekvence kódující volitelné markery jsou dobře známé v oboru a zahrnují sekvence, které kódují genové produkty udělující rezistenci vůči antibiotikům nebo antimetabolitům, nebo které dodávají auxotrofické požadavky. Příklady takových sekvencí zahrnují sekvence, které kódují rezistenci mezi mnoha jinými k erytromycinu, thiostreptonu nebo kanamycinu.

5.2.2. Transformace hostitelských buněk

Předkládaný vynález dále poskytuje transformované hostitelské buňky obsahující polynukleotidovou molekulu nebo rekombinantní vektor, které jsou předmětem vynálezu, a nové kmeny nebo buněčné linie od nich odvozené. Hostitelské buňky užitečné pro provedení vynálezu jsou přednostně buňky *Streptomyces*, ačkoli mohou být použity i jiné prokaryotické nebo eukaryotické buňky. Takové transformované hostitelské buňky typicky zahrnují, ale nejsou omezeny na mikroorganismy, jako jsou například bakterie transformované mezi jinými rekombinantní bakteriofágovými DNA, plazmidovými DNA nebo kosmidovými DNA vektory, nebo kvasinkami transformovanými rekombinantními vektory.

Polynukleotidové molekuly, které jsou předmětem předkládaného vynálezu, jsou zamýšlené, aby fungovaly u buněk *Streptomyces*, ale mohou být také transformovány do jiných bakteriálních nebo eukaryotických buněk, například pro klonovací nebo expresní účely. Může být typicky použit kmen *E. coli*, jako například kmen DH5 α , dostupný z Americké sbírky typových kultur (ATCC), Rockville, MD, USA) (přístupové číslo 31343) a z komerčních zdrojů (Stratagene). Přednostní hostitelské buňky zahrnují kvasinkové buňky, ačkoli mohou být účinně použity i savčí buňky nebo buňky hmyzu.

Rekombinantní expresní vektor, který je předmětem vynálezu, je přednostně transformován nebo tranfektován do jedné nebo více hostitelských buněk nebo významně homogenní kultury buněk. Expresní vektor je obecně začleněn do hostitelských buněk ve shodě se známými technikami, jako jsou například protoplastová transformace, precipitace kalcium fosfátem, reakce s chloridem vápenatým, mikroinjikace, elektroporace, transfekce kontaktem s rekombinovaným virem, transfekce řízená lipozómem, transfekce s DEAE dextranem, transdukce, konjugace nebo bombardování mikroprojektily. Volba transformačních látek může být provedena standardními postupy, jako je například pro buňky exprimující volitelný marker volba, například antibiotické rezistence sdružené s rekombinantním vektorem, jak je popsáno výše.

Jakmile je expresní vektor začleněn do hostitelské buňky, může být integrace a udržení *aveC* kódující sekvence, buďto v chromozómu hostitelské buňky, nebo epizomálně, potvrzena standardními technikami, například Southern hybridizační analýzou, restriční enzymovou analýzou, PCR analýzou zahrnující PCR s reverzní transkriptázou (rt-PCR), nebo imunologickou analýzou za účelem detekce očekávaného genového

produktu. Hostitelské buňky obsahující a/nebo exprimující rekombinantní aveC kódující sekvenci, mohou být identifikovány jakýmkoli z alespoň čtyř obecných přístupů, které jsou dobře známe v oboru, které zahrnují: i) DNA-DNA, DNA-RNA, nebo RNA-antisense RNA hybridizaci; ii) detekci přítomnosti funkčnosti "markerového" genu; iii) posouzení stupně transkripce měřením exprese aveC-specifických mRNA transkriptů v hostitelské buňce; a iv) detekci přítomnosti zralého polypeptidového produktu například imunoanalýzou nebo přítomností AveC biologické aktivity (jako je například produkce nebo specifické poměry a množství avermektinů ukazující na AveC aktivitu v například *S. avermitilis* hostitelských buňkách).

5.2.3. Exprese a charakterizace rekombinantního AveC genového produktu

Jakmile byla stabilně vložena do příslušné hostitelské buňky aveC kódující sekvence, je transformovaná hostitelská buňka klonově propagována, a výsledné buňky mohou růst za podmínek napomáhajících maximální produkci AveC genového produktu. Takové podmínky typicky zahrnují rostoucí buňky do vysoké denzity. Kde expresní vektor obsahuje induktibilní promotor, jsou použity příslušné indukční podmínky, jako jsou například teplotní posun, deplece živin, přidání bezdůvodných induktérů (jako jsou například analoga karbohydrátů, jako například izopropyl- β -D-thiogalaktopyranosidu (IPTG)), akumulace nadbytku metabolických vedlejších produktů, nebo podobně, jak je požadováno k indukování exprese.

Kde je exprimovaný AveC genový produkt zadržen uvnitř hostitelských buněk, jsou tyto buňky sesbírány a zlyzovány, a produkt je izolován a purifikován z lyzátu za extrakčních podmínek známých v oboru, aby se minimalizovala degradace bílkovin, jako jsou například teplota 4°C nebo přítomnost inhibitorů proteáz, nebo obojí. Kde je exprimovaný AveC genový

produkt sekretován z hostitelských buněk, může být vyčerpané živné médium jednoduše sebráno a produkt z něj může být izolován.

Exprimovaný AveC genový produkt může být izolován nebo významně purifikován podle vhodnosti z buněčných lyzátů nebo kultivačního média za použití standardních způsobů zahrnujících, ale neomezujících se na jakoukoli kombinaci z následujících způsobů: amonsulfátová precipitace, frakcionce podle velikosti, ionexová chromatografie, HPLC, denzitní centrifugace a afinitní chromatografie. Kde exprimovaný AveC genový produkt vykazuje biologickou aktivitu, může být zvyšující se čistota preparátu monitorována v každém kroku purifikačního postupu použitím jakékoli vhodné analýzy. Ať už exprimovaný AveC genový produkt vykazuje biologickou aktivitu či nikoli, může být detekován na základě například velikosti, nebo reaktivity s protilátkou jinak specifickou pro AveC, nebo pomocí přítomnosti fúzní návěsti. Jak je zde používáno, je AveC genový produkt "významně purifikován" tam, kde produkt konstituuje více než 20 váhových % bílkoviny v konkrétním preparátu. Jak je zde také používáno, je AveC genový produkt "izolován", kde tento produkt konstituuje alespoň 80 váhových % bílkoviny v konkrétním preparátu.

Předkládaný vynález tedy poskytuje rekombinantně-exprimovaný izolovaný nebo významně purifikovaný *S. avermitilis* AveC genový produkt obsahující aminokyselinovou sekvenci kódovanou AveC genový produkt-kódující sekvencí plazmidu pSE186 (ATCC 209604), nebo aminokyselinovou sekvencí z Obrázku 1 (SEQ ID č. 2), nebo její významnou část a její homologa.

Předkládaný vynález dále poskytuje rekombinantně-exprimovaný izolovaný nebo významně purifikovaný *S. hygroscopicus* AveC

homologní genový produkt obsahující aminokyselinovou sekvenci SEQ ID č. 4, nebo její významnou část a její homologa.

Předkládaný vynález dále poskytuje způsob produkce AveC genového produktu zahrnující kultivaci hostitelské buňky transformované rekombinantním expresním vektorem, kde řečený vektor zahrnuje polynukleotidovou molekulu mající nukleotidovou sekvenci kódující AveC genový produkt, kterážto polynukleotidová molekula je v operačním spojení s jedním nebo více regulačních elementů, které kontrolují expresi polynukleotidové molekuly v hostitelské buňce za podmínek napomáhajících produkci rekombinantního AveC genového produktu a získání AveC genového produktu z buněčné kultury.

Rekombinantně exprimovaný *S. avermitilis* AveC genový produkt je užitečný pro celou řadu účelů zahrnujících vyhledávání sloučenin, které narušují funkci AveC genového produktu a tím modulují biosyntézu avermektinů, a dále získávání protilátek namířených proti AveC genovému produktu.

Jakmile je AveC genový produkt o dostatečné čistotě získán, může být charakterizován standardními způsoby zahrnujícími SDS-PAGE, chromatografií na základě separace podle velikosti, aminokyselinovou sekvenční analýzu, biologickou aktivitu v produkujících příslušných produktech v biosyntetické dráze avermektinů, atd. Aminokyselinová sekvence AveC genového produktu může být například určena za použití standardních sekvenčních technik pro peptidy. AveC genový produkt může být dále charakterizován za použití analýzy hydrofilicity (viz například Hopp a Woods, 1981, Proc. Nat. Acad. Sci. USA 78:3824), nebo analogickým softwarovým algoritmem za účelem identifikace hydrofobních a hydrofilních oblastí AveC genového produktu. Strukturální analýza může být provedena za účelem identifikace oblastí AveC genového produktu, které jsou

zodpovědné za sekundární strukturu. K mapování a studiu míst interakcí mezi AveC genovým produktem a jeho substrátem mohou být použity biofyzikální metody, jako jsou například rentgenová krystalografie (Engstrom, 1974, Biochem Exp Biol 11:7-13) počítačové modelování (Fletterick a Zoller (eds), 1986, v: Current Communications in Molecular Biology, Cold Springs Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY) a nukleární magnetická rezonance (NMR). Informace získané z těchto studií mohou být použity k vybrání nových míst pro mutace v aveC ORF, aby se pomohlo vyvinout nové kmeny *S. avermitilis* mající více žádoucí charakteristiky produkce avermektinů.

5.3. Konstrukce a použití AveC mutant

Předkládaný vynález poskytuje polynukleotidovou molekulu obsahující nukleotidovou sekvenci, která je jinak stejná jako *S. avermitilis* aveC alela nebo její degenerační varianta, nebo AveC genový produkt-kódující sekvence plazmidu pSE186 (ATCC 209604), nebo její degenerační varianta, nebo nukleotidová sekvence aveC ORF *S. avermitilis*, jak je prezentováno na Obrázku 1 (SEQ ID č. 1), nebo její degenerační varianta, ale které dále obsahují jednu nebo více mutací, takže buňky kmene *S. avermitilis* ATCC 53692, v kterých byl divoký typ aveC alely inaktivován, a který exprimuje polynukleotidovou molekulu obsahující mutovanou nukleotidovou sekvenci, nebo její degenerační variantu, produkují odlišný poměr nebo množství avermektinů, které jsou produkovány buňkami kmene *S. avermitilis* ATCC 53692, které exprimují pouze divoký typ aveC alely.

Podle předkládaného vynálezu mohou být takové polynukleotidové molekuly použity k produkci nových kmenů *S. avermitilis*, které vykazují detekovatelnou změnu v produkci avermektinů ve srovnání se stejným kmenem, který exprimuje pouze divoký typ aveC alely. V přednostní formě vynálezu jsou takové

polynukleotidové molekuly užitečné pro produkci nových kmenů *S. avermitilis*, které produkují avermektiny ve sníženém poměru třídy 2:1 ve srovnání se stejným kmenem, který exprimuje pouze divoký typ *aveC* alely. V další přednostní formě jsou takové polynukleotidové molekuly užitečné pro produkci nových kmenů *S. avermitilis*, které produkují zvýšená množství avermektinů ve srovnání se stejným kmenem, který exprimuje pouze jediný divoký typ *aveC* alely. V další přednostní formě jsou takové polynukleotidové molekuly užitečné pro produkci nových kmenů *S. avermitilis*, v kterých *aveC* gen inaktivován.

Mutace *aveC* alely nebo kódující sekvence jakékoli mutace, které vedou k jedné nebo více delecím, adicím nebo substitucím do *AveC* genového produktu, nebo které vedou ke vzniku zkomoleného *AveC* genového produktu, nebo k jakékoli jejich kombinaci, a které vedou k požadovanému výsledku. Takové mutované sekvence *aveC* alely jsou také zamýšleny, aby obsahovaly jejich degenerované varianty. Předkládaný vynález například poskytuje polynukleotidové molekuly obsahující nukleotidovou sekvenci *aveC* alely nebo její degenerované varianty, nebo *AveC* genový produkt-kódující sekvenci plazmidu pSE186 (ATCC 209604), nebo její degenerovanou variantu, nebo nukleotidovou sekvenci *aveC* ORF *S. avermitilis*, jak je uvedeno na Obrázku 1 (SEQ ID č. 1), nebo její degenerovanou variantu, ale které dále obsahují jednu nebo více mutací, které kódují substituci aminokyselinového rezidua odlišným aminokyselinovým reziduem ve zvolených pozicích v *AveC* genovém produktu. V několika neomezujících formách vynálezu, z nichž několik je uvedeno příkladem níže, mohou být takové substituce provedeny v jakýchkoli aminokyselinových pozicích *AveC* genového produktu, které korespondují s aminokyselinovými pozicemi 38, 48, 55, 89, 99, 111, 136, 138, 139, 154, 179, 228, 230, 238, 266, 275, 289 nebo 298 sekvence SEQ ID č. 2, nebo některými jejich kombinacemi.

Mutace *aveC* kódující sekvence jsou provedeny jakoukoli ze známých metod zahrnujících použití PCR náchylné k chybám, nebo kazetové mutagenese. K narušení sekvence *aveC* alely nebo ORF definovaným způsobem, například vložení jednoho nebo více restričních míst, nebo terminačního kodónu, do specifických oblastí v *aveC* alele nebo ORF může být například použita mutagenese řízená oligonukleotidem. K tvorbě velkých knihoven polynukleotidů mající nukleotidové sekvence kódující *aveC* mutace mohou být také použity metody například popsané v patentech US Patent 5605793, US Patent 5830721 a US Patent 5837458, které zahrnují náhodnou fragmentaci, opakované cykly mutagenese a nukleotidové přemísťování.

Užitečné mohou být cílené mutace, obzvláště tam, kde slouží k narušení jednoho nebo více konzervovaných aminokyselinových reziduí v *AveC* genovém produktu. Například srovnání odvozených aminokyselinových sekvencí *AveC* genových produktů a *AveC* homologních genových produktů ze *S. avermitilis* (SEQ ID č. 2), *S. griseochromogenes* (SEQ ID č. 5) a *S. hygroscopicus* (SEQ ID č. 4), jak jsou uvedeny na Obrázku 6, ukazuje místa významné konzervace aminokyselinových reziduí mezi těmito druhy. V tvorbě nových mutovaných kmenů, které vykazují požadované alterace produkce avermektinů může být obzvláště účinná cílená mutagenese, která vede ke změně v jednom nebo více těchto konzervovaných aminokyselinových reziduích.

Užitečná může být také náhodná mutagenese, která může být provedena expozicí buněk *S. avermitilis* ultrafialovému záření nebo rentgenovému záření, nebo chemickým mutagenům, jako jsou například N-metyl-N'-nitrosoguanidin, etyl metan sulfonát, kyselina dusičná nebo nitrogen mustard. Pro shrnutí technik mutagenese viz například Ausubel, 1989 výše.

Jakmile jsou mutované polynukleotidové sekvence generovány, jsou prohlíženy, aby se určilo, zdali mohou modulovat biosyntézu avermektinů v *S. avermitilis*. V přednostní formě vynálezu je polnukleotidová molekula mající mutovanou nukleotidovou sekvenci testována komplementací kmene *S. avermitilis*, v kterém byl *aveC* gen inaktivován za vzniku *aveC* negativního (*aveC*⁻) pozadí. V neomezujícím způsobu je mutovaná polynukleotidová molekula sestříhaná do expresního plazmidu v operačním spojení s jedním nebo více regulačních elementů, kterýžto plazmid také přednostně obsahuje jeden nebo více genů pro lékovou rezistenci, které umožňují výběr transformovaných buněk. Tento vektor je poté transformován do *aveC* hostitelských buněk za pomoci známých technik a transformované buňky jsou vybrány a kultivovány v příslušném fermentačním médiu za podmínek, které umožňují nebo indukují produkci avermektinů. Fermentační produkty jsou poté analyzovány pomocí HPLC, aby se určila schopnost mutované polynukleotidové molekuly ke komplementaci hostitelské buňky. Některé vektory nesoucí mutované polynukleotidové molekuly schopné snížit B2:B1 poměr avermektinů zahrnující pSE 188, pSE 199, pSE 231, pSE 239 a pSE 290 až pSE 297, jak je uvedeno příkladem v Části 8,3 níže.

Předkládný vynález poskytuje způsoby identifikace mutací *S. avermitilis* *aveC* ORF schopných narušit poměr a/nebo množství produkovaných avermektinů. V přednostní formě poskytuje předkládaný vynález způsob identifikace mutací schopných narušit poměr třídy 2:1 produkovaných avermektinů, kterýžto způsob zahrnuje (a) určení poměru třídy 2:1 avermektinů produkovaných buňkami kmene *S. avermitilis*, v kterých byla nativní *aveC* alela inaktivována, a do kterých byla vložena polynukleotidová molekula obsahující nukleotidovou sekvenci kódující mutovaný *AveC* genový produkt, a tato molekula je exprimována; (b) určení poměru třídy 2:1 avermektinů

produkovaných buňkami stejného kmene *S. avermitilis* jako v kroku (a), ale kteréžto buňky místo toho exprimují pouze divoký typ *aveC* alely nebo ORF z Obrázku 1 (SEQ ID č. 1), nebo nukleotidovou sekvenci, která je k ORF homologní; a (c) porovnání poměru třídy 2:1 avermektinů produkovaných buňkami *S. avermitilis* z kroku (a) s poměrem třídy 2:1 avermektinů produkovaných buňkami *S. avermitilis* z kroku (b); takže je-li poměr třídy 2:1 avermektinů produkovaných buňkami *S. avermitilis* z kroku (a) odlišný od poměru třídy 2:1 avermektinů produkovaných buňkami *S. avermitilis* z kroku (b), poté může být identifikována mutace *aveC* ORF schopná pozměnit poměr třídy 2:1 avermektinů. V přednostní formě vynálezu je poměr třídy 2:1 avermektinů touto mutací snížen.

V další přednostní formě poskytuje předkládaný vynález způsob identifikace mutací *aveC* ORF nebo genetických konstruktů obsahujících *aveC* ORF schopné změnit množství produkovaných avermektinů, kterýžto způsob zahrnuje: (a) určení množství avermektinů produkovaných buňkami kmene *S. avermitilis*, v kterých byla nativní *aveC* alela inaktivována, a do kterých byla vložena polynukleotidová molekula obsahující nukleotidovou sekvenci kódující mutovaný *AveC* genový produkt, nebo obsahující genetický konstrukt zahrnující nukleotidovou sekvenci kódující *AveC* genový produkt a tato molekula je exprimována; (b) určení množství avermektinů produkovaných stejným kmenem *S. avermitilis* jako v kroku (a), ale kterýžto kmen místo toho exprimuje pouze divoký typ *aveC* alely nebo homologní nukleotidovou sekvenci; a (c) porovnání množství avermektinů produkovaných buňkami *S. avermitilis* z kroku (a) s množstvím avermektinů produkovaných buňkami *S. avermitilis* z kroku (b); takže je-li množství avermektinů produkovaných buňkami *S. avermitilis* z kroku (a) odlišné od množství avermektinů produkovaných buňkami *S. avermitilis* z kroku (b), poté může být identifikována mutace *aveC* ORF nebo genetického

konstruktu schopná pozměnit poměr třídy 2:1 avermektinů. V přednostní formě vynálezu je produkováné množství avermektinů touto mutací zvýšeno.

Jakýkoli z výše uvedených způsobů k identifikaci mutací může být proveden za použití fermentačního kultivačního média přednostně suplementovaného cyklohexan karboxylovou kyselinou, ačkoli mohou být použity i jiné vhodné prekurzory mastných kyselin, jako jsou například jakékoli prekurzory mastných kyselin uvedených v Tabulce 1.

Jakmile je identifikována mutovaná polynukleotidová molekula, která moduluje produkci avermektinů žádoucím směrem, může být určeno umístění mutace v nukleotidové sekvenci. Polynukleotidová molekula mající nukleotidovou sekvenci kódující mutovaný AveC genový produkt může být například izolována pomocí PCR a podrobena DNA sekvenční analýze za použití známých způsobů. Mutace zodpovědná(é) za alteraci produkce avermektinů může být určena srovnáním DNA sekvence mutovaé aveC alely se sekvencí divokého typu aveC alely. Ve specifických, avšak neomezujících formách předkládaného vynálezu vedly *S. avermitilis* AveC genové produkty obsahující buďto jedinou aminokyselinovou substituci v jakémkoli z reziduí 55 (S55F), 138 (S138T), 139 (A139T), nebo 230 (G230D), nebo dvě substituce v pozicích 138 (S138T) a 139 (A139T nebo A139F) ke změnám ve funkci AveC genového produktu, takže poměr třídy 2:1 produkováných avermektinů byl narušen (viz Část 8 níže), kde uvedené aminokyselinové pozice korespondují s pozicemi na Obrázku 1 (SEQ ID č.2). Navíc bylo prokázáno, že následujících sedm kombinací mutací účinně snižuje poměr třídy 2:1 avermektinů: 1) D48E; 2) S138T/A139T/G179S; 3) Q38P/L136P/E238D; 4) F99S/S138T/A139T/G179S; 5) A139T/M228T; 6) G111V/P289T. Jak je zde používáno, výše uvedená označení, jako například A139T,

ukazují původní aminokyselinové reziduum jednopísmenovým označením, v kterém je v tomto případě alanin (A) v uvedené pozici, která je v tomto případě pozice 139 (týká se SEQ ID č.2) polypeptidu, a následuje aminokyselinové reziduum, které nahrazuje původní aminokyselinové reziduum, kterým je v tomto případě threonin (T). Z tohoto důvodu jsou polynukleotidové sekvence mající nukleotidové sekvence, které kódují mutované *S. avermitilis* genové produkty obsahující aminokyselinové substituce nebo delece v jedné nebo více aminokyselinových pozic 38, 48, 55, 89, 99, 111, 136, 138, 139, 154, 179, 228, 230, 238, 266, 275, 289, nebo 298 (viz Obrázek 1), nebo jakékoli jejich kombinace, zahrnutý předkládaným vynálezem.

V přednostní formě vynálezu kódují takové mutace aminokyselinové substituce vybrané z jedné nebo více skupin obsahující:

- a) aminokyselinové reziduum Q v pozici 38 nahrazené P nebo aminokyselinou, která je konzervativní substitucí pro P;
- b) aminokyselinové reziduum D v pozici 48 nahrazené E nebo aminokyselinou, která je konzervativní substitucí pro E;
- c) aminokyselinové reziduum A v pozici 89 nahrazené T nebo aminokyselinou, která je konzervativní substitucí pro T;
- d) aminokyselinové reziduum F v pozici 99 nahrazené S nebo aminokyselinou, která je konzervativní substitucí pro S;
- e) aminokyselinové reziduum G v pozici 111 nahrazené V nebo aminokyselinou, která je konzervativní substitucí pro V;
- f) aminokyselinové reziduum L v pozici 136 nahrazené P nebo aminokyselinou, která je konzervativní substitucí pro P;
- g) aminokyselinové reziduum S v pozici 138 nahrazené T nebo aminokyselinou, která je konzervativní substitucí pro T;
- h) aminokyselinové reziduum A v pozici 139 nahrazené T nebo F nebo aminokyselinou, která je konzervativní substitucí pro T nebo F;

- i) aminokyselinové reziduum K v pozici 154 nahrazené E nebo aminokyselinou, která je konzervativní substitucí pro E;
 - j) aminokyselinové reziduum G v pozici 179 nahrazené S nebo aminokyselinou, která je konzervativní substitucí pro S;
 - k) aminokyselinové reziduum M v pozici 228 nahrazené T nebo aminokyselinou, která je konzervativní substitucí pro T;
 - l) aminokyselinové reziduum E v pozici 238 nahrazené D nebo aminokyselinou, která je konzervativní substitucí pro D;
 - m) aminokyselinové reziduum P v pozici 289 nahrazené L nebo aminokyselinou, která je konzervativní substitucí pro L; a
 - n) aminokyselinové reziduum Q v pozici 298 nahrazené H nebo aminokyselinou, která je konzervativní substitucí pro H;
- kde konzervativní aminokyselinové substituce jsou stejné, jako je definováno výše v Sekci 5.1

V další přednostní formě vynálezu kódují takové mutace kombinací aminokyselinových substitucí, kde kombinace substituovaných aminokyselinových reziduí je vybrána ze skupiny obsahující:

- a) aminokyselinová rezidua S138 a A139;
- b) aminokyselinová rezidua D48 a A89;
- c) aminokyselinová rezidua S138 a A139 a G179;
- d) aminokyselinová rezidua Q38, L136 a E238;
- e) aminokyselinová rezidua F99, S138, A139 a G179;
- f) aminokyselinová rezidua A139 a M228;
- g) aminokyselinová rezidua G111 a P289; a
- h) aminokyselinová rezidua A139, K154 a Q298.

V další přednostní formě vynálezu jsou specifické kombinace mutací aveC alely užitečné pro efektivní snížení poměru třídy 2:1 avermektinů podle předkládaného vynálezu vybrány z jedné nebo více skupin obsahujících:

- a) S138T/A139T
- b) S138T/A139F

- c) D48E/A89T;
- d) S138T/A139T/G179S;
- e) Q38P/L136P/E238D;
- f) F99S/S138T/A139T/G179S;
- g) A139T/M228T;
- h) G111V/P289L; a
- i) A139T/K154E/Q298H.

Předkládaný vynález dále poskytuje preparáty pro přípravu nových kmenů *S. avermitilis*, jejichž buňky obsahují mutovanou *aveC* alelu, která vede k narušení produkce avermektinů. Předkládaný vynález například poskytuje rekombinantní vektory, které mohou být použity k zacílení jakékoli polynukleotidové molekuly obsahující mutované nukleotidové sekvence, které jsou předmětem předkládaného vynálezu na místo *aveC* genu chromozómu *S. avermitilis* buďto k inzerci nebo k nahrazení *aveC* ORF nebo jeho části pomocí homologní rekombinace. Podle předkládaného vynálezu však může polynukleotidová molekula obsahující zde poskytnutou mutovanou nukleotidovou sekvenci, která je předmětem předkládaného vynálezu, také modulovat biosyntézu avermektinů, je-li inzerována do chromozómu v místě jiném než je *aveC* gen, nebo je-li udržována epizomálně v buňkách *S. avermitilis*. Předkládaný vynález tedy také poskytuje vektory obsahující polynukleotidovou molekulu obsahující mutovanou nukleotidovou sekvenci, která je předmětem předkládaného vynálezu, kteréžto vektory mohou být použity k inzerci polynukleotidové molekuly na místo v chromozómu *S. avermitilis* jiné než je *aveC* gen, nebo mohou být udržovány epizomálně.

V přednostní formě poskytuje předkládaný vynález vektory pro náhradu genů, které mohou být použity k inzerci mutované *aveC* alely nebo její degenerované varianty do buněk kmene *S. avermitilis*, čímž dochází k tvorbě nových kmenů *S. avermitilis*, jejichž buňky produkují avermektiny v narušeném

poměru třídy 2:1 ve srovnání s buňkami stejného kmene, který místo toho exprimuje pouze divoký typ *aveC* alely. V přednostní formě je poměr třídy 2:1 avermektinů produkovaných buňkami snížen. Takové vektory nahrazující geny mohou být konstruovány za použití mutovaných polynukleotidových molekul přítomných ve zde poskytnutých expresních vektorech, jako jsou například pSE188, pSE199 a pSE231, kteréžto expresní vektory jsou uvedeny příkladem v Části 8 níže.

V další přednostní formě poskytuje předkládaný vynález vektory, které mohou být použity k inzerci mutované *aveC* alely nebo její degenerované varianty do buněk kmene *S. avermitilis* k tvorbě nových kmenů buněk, které produkují avermektiny v narušeném množství ve srovnání s buňkami stejného kmene, který místo toho exprimuje pouze divoký typ *aveC* alely. V přednostní formě je množství avermektinů produkovaných buňkami zvýšeno. Ve specifické, avšak neomezuující formě vynálezu zahrnují takový vektor silný promotor, jak je známý v oboru, jako je například silný konstitutivní *ermE* promotor z *Sacharopolysora erythraea*, který je situován ve směru nahoru od a v operačním spojení s *aveC* alelou. Takovým vektorem může být pSE189, popsáný v Příkladu provedení vynálezu 11 níže, nebo může být konstruován za použití mutované *aveC* alely plazmidu pSE189.

V další přednostní formě poskytuje předkládaný vynález vektory pro náhradu genů, které jsou užitečné pro inaktivaci *aveC* genu u divokého typu kmene *S. avermitilis*. V neomezuující formě vynálezu mohou být takové vektory nahrazující gen zkonstruovány za použití mutované polynukleotidové molekuly přítomné v plazmidu pSE180 (ATCC 209605), která je uvedena příkladem v Části 8.1 níže (Obrázek 3). V další přednostní formě poskytuje předkládaný vynález vektory pro náhradu genů, které zahrnují polynukleotidovou molekulu obsahující nebo

skládající se z nukleotidových sekvencí, které přirozeně hraničí s aveC genem in situ v chromozómu *S. avermitilis*, a zahrnují například hraničící nukleotidové sekvence uvedené na Obrázku 1 (SEQ ID č.1), kteréžto vektory mohou být použity k vymazání *S. avermitilis* aveC ORF.

Předkládaný vynález dále poskytuje způsoby pro přípravu nových kmenů *S. avermitilis* zahrnující buňky, které exprimují mutovanou aveC alelu, a které produkují porušený poměr a/nebo množství avermektinů ve srovnání s buňkami stejného kmene *S. avermitilis*, které exprimují pouze divoký typ aveC alely. V přednostní formě poskytuje předkládaný vynález způsob pro přípravu nových kmenů *S. avermitilis* zahrnující buňky, které exprimují mutovanou aveC alelu, a které produkují porušený poměr třídy 2:1 avermektinů ve srovnání s buňkami stejného kmene *S. avermitilis*, které exprimují pouze divoký typ aveC alely, dále zahrnující transformující se buňky kmene *S. avermitilis* s vektorem, který nese mutovanou aveC alelu kódující genový produkt, který narušuje poměr třídy 2:1 avermektinů produkovaných buňkami kmene *S. avermitilis* exprimujícími mutovanou aveC alelu ve srovnání s buňkami stejného kmene *S. avermitilis*, které exprimují pouze divoký typ aveC alely, a vybrání transformovaných buněk, které produkují narušený poměr třídy 2:1 ve srovnání s poměrem třídy 2:1 produkovaným buňkami kmene, který exprimuje pouze divoký typ aveC alely. V přednostnější formě poskytuje předkládaný vynález způsob pro přípravu nového kmene *S. avermitilis* zahrnující transformující se buňky kmene *S. avermitilis* s vektorem schopným vytvořit mutaci v aveC alele takových buněk, kde mutace aveC alely vede k substituci v kódovaném AveC genovém produktu různého aminokyselinového rezidua v jedné nebo více aminokyselinových pozicích odpovídajících aminokyselinovým reziduům 38, 48, 55, 89, 99, 111, 136, 138, 139, 154, 179, 228, 230, 238, 266, 275, 289, nebo 298 o

sekvenci SEQ ID č.2, takže buňky kmene *S. avermitilis*, v kterých byla *aveC* alela mutována, produkují poměr třídy 2:1, který je odlišný od poměru produkovaného buňkami stejného kmene *S. avermitilis*, které exprimují pouze divoký typ *aveC* alely. V přednostní formě vynálezu je snížen poměr třídy 2:1 avermektinů.

Jak je zde používáno, tam, kde aminokyselinové reziduum kódované *aveC* alelou v chromozómu *S. avermitilis*, nebo ve vektoru či izolované polynukleotidové molekule, která je předmětem předkládaného vynálezu je označováno jako "odpovídající" konkrétnímu aminokyselinovému reziduu se sekvencí SEQ ID č.2, nebo kde aminokyselinová substituce je označována jako vyskytující se v konkrétní pozici "odpovídající" specifickému očíslovanému aminokyselinovému reziduu se sekvencí SEQ ID č.2, týká se aminokyselinové reziduum stejného relativního umístění v *AveC* genovém produktu, který osoba znalá oboru může rychle určit pomocí odkazu na aminokyselinovou sekvenci prezentovanou zde jako SEQ ID č.2.

Předkládaný vynález dále poskytuje způsoby pro přípravu nových kmenů, kde specifické mutace v *aveC* alele kódující konkrétní mutace jsou uváděny jako základní změny ve specifických nukleotidových pozicích v *aveC* alele "odpovídající" konkrétním nukleotidovým pozicím, jak je uvedeno v sekvenci SEQ ID č. 1. Jak je uvedeno výše, s ohledem na odpovídající aminokyselinové pozice, kde nukleotidová pozice v *aveC* alele je uváděna jako "odpovídající" konkrétní nukleotidové pozici v sekvenci SEQ ID č. 1, týká se nukleotid stejného relativního umístění v *aveC* nukleotidové sekvenci, kterou může osoba znalá oboru rychle určit pomocí odkazu na nukleotidovou sekvenci prezentovanou zde jako sekvence SEQ ID č.1.

V další přednostní formě poskytuje předkládaný vynález způsob pro přípravu nových kmenů *S. avermitilis* zahrnující buňky, které produkují porušená množství avermektinů, zahrnující transformující se buňky kmene *S. avermitilis* s vektorem, který nese mutovanou *aveC* alelu nebo genetický konstrukt obsahující *aveC* alelu, jejíž exprese vede k narušení množství avermektinů produkovaných buňkami kmene *S. avermitilis* exprimujícími mutovanou *aveC* alelu nebo genetický konstrukt ve srovnání s buňkami stejného kmene, které exprimují pouze divoký typ *aveC* alely, a vybrání transformovaných buněk, které produkují avermektiny v narušeném množství ve srovnání s množstvím avermektinů produkovaných buňkami kmene, který exprimuje pouze divoký typ *aveC* alely. V přednostní formě vynálezu je zvýšeno množství avermektinů produkovaných transformovanými buňkami.

V další přednostní formě poskytuje předkládaný vynález způsob pro přípravu nových kmenů *S. avermitilis*, jejichž buňky obsahují inaktivovanou *aveC* alelu, zahrnující transformující se buňky kmene *S. avermitilis*, které exprimují jakoukoli *aveC* alelu s vektorem, který inaktivuje *aveC* alelu, a vybrání transformovaných buněk, v kterých byla *aveC* alela inaktivována. V přednostnější, avšak neomezuující formě vynálezu jsou buňky kmene *S. avermitilis* transformovány vektorem nahrazujícím gen, který nese *aveC* alelu, která byla inaktivována mutací nebo náhradou části *aveC* alely heterologní genovou sekvencí, a jsou vybrány transformované buňky, v kterých byla jinak nativní *aveC* alela nahrazena inaktivovanou *aveC* alelou. Inaktivace *aveC* alely může být určena HPLC analýzou fermentačních produktů, jak je popsáno níže. Ve specifické, avšak neomezuující formě vynálezu popsané v Části 8.1 níže byla *aveC* alela inaktivována inzercí *ermE* genu ze *Sacharopolyspora erythraea* do *aveC* ORF.

Předkládaný vynález dále poskytuje nové kmeny *S. avermitilis* zahrnující buňky, které byly transformovány jakýmkoli polynukleotidovými molekulami nebo vektory, které jsou předmětem předkládaného vynálezu. V přednostní formě poskytuje předkládaný vynález nové kmeny *S. avermitilis* zahrnující buňky, které exprimují mutovanou *aveC* alelu, nebo její degenerovanou variantu na místo nebo navíc k divokému typu *aveC* alely, kde buňky nového kmene produkují avermektiny v narušeném poměru třídy 2:1 ve srovnání s poměrem třídy 2:1 avermektinů produkovaných buňkami stejného kmene, které exprimují pouze divoký typ *aveC* alely. V přednostní formě vynálezu je snížen narušený poměr třídy 2:1 avermektinů produkovaný novými buňkami. Takové nové kmeny jsou užitečné pro produkci komerčně žádoucích avermektinů, jako je například doramektin, ve velkém měřítku. V přednostnější formě poskytuje předkládaný vynález nové kmeny *S. avermitilis* zahrnující jakoukoli z výše uvedených mutací nebo kombinací mutací v *aveC* alele v nukleotidových pozicích odpovídajících pozicím prezentovaných výše, nebo které jinak kódují jakoukoli z výše uvedených aminokyselinových substitucí *AveC* genového produktu. Ačkoli takové mutace mohou být přítomny v takových buňkách na extrachromozomální části, jako je například plazmid, je preferováno, že takové mutace jsou přítomny v *aveC* alele lokalizované na chromozómu *S. avermitilis*. V přednostní formě poskytuje předkládaný vynález kmen *Streptomyces avermitilis* zahrnující buňky mutací v *aveC* alele, která kóduje *AveC* genový produkt mající substituci v jedné nebo více aminokyselinových pozicích odpovídajících aminokyselinovým reziduíům 38, 48, 55, 89, 99, 111, 136, 138, 139, 154, 179, 228, 230, 238, 266, 275, 289, nebo 298 v sekvenci SEQ ID č. 2, kde buňky produkují poměr třídy 2:1 avermetinů, který je odlišný od poměru produkovaného buňkami stejného kmene *S. avermitilis*, který exprimuje divoký typ *aveC* alely.

Primárním cílem vyhledávacích analýz zde popsaných je identifikovat mutované alely *aveC* genu, jejichž exprese je buňkách *S. avermitilis* narušena a konkrétněji dochází ke snížení poměru třídy 2:1 avermektinů. V přednostní formě vynálezu je poměr B2:B1 avermektinů produkovaných buňkami nového kmene *S. avermitilis*, který je předmětem předkládaného vynálezu, a který exprimuje mutovanou *aveC* alelu nebo její degenerovanou variantu, a který je předmětem předkládaného vynálezu, zhruba 1,6:1 nebo méně. V přednostnější formě vynálezu je poměr 0,84:1 nebo méně. V přednostnější formě vynálezu je poměr 0,80:1 nebo méně. V přednostnější formě vynálezu je poměr 0,75:1 nebo méně. V přednostnější formě vynálezu je poměr 0,73:1 nebo méně. V přednostnější formě vynálezu je poměr 0,68:1 nebo méně. V ještě přednostnější formě vynálezu je poměr 0,67:1 nebo méně. V přednostnější formě vynálezu je poměr 0,57:1 nebo méně. V ještě přednostnější formě vynálezu je poměr 0,53:1 nebo méně. V ještě přednostnější formě vynálezu je poměr 0,42:1 nebo méně. V ještě přednostnější formě vynálezu je poměr 0,40:1 nebo méně.

V specifické formě vynálezu popsané níže produkují nové buňky, které jsou předmětem vynálezu, cyklohexyl B2: cyklohexyl B1 avermektiny v poměru menším než 1,6:1. V odlišné specifické formě vynálezu popsané níže produkují nové buňky, které jsou předmětem vynálezu, cyklohexyl B2:cyklohexyl B1 avermektiny v poměru menším než 0,94:1. V další odlišné specifické formě vynálezu popsané níže produkují nové buňky, které jsou předmětem vynálezu, cyklohexyl B2:cyklohexyl B1 avermektiny v poměru menším než 0,88:1. V další odlišné specifické formě vynálezu popsané níže produkují nové buňky, které jsou předmětem vynálezu, cyklohexyl B2:cyklohexyl B1 avermektiny v poměru menším než 0,84:1. V ještě další odlišné specifické formě vynálezu popsané níže produkují nové buňky, které jsou

předmětem vynálezu, cyklohexyl B2:cyklohexyl B1 avermektiny v poměru menším než 0,75:1. V ještě další odlišné specifické formě vynálezu popsané níže produkují nové buňky, které jsou předmětem vynálezu, cyklohexyl B2:cyklohexyl B1 avermektiny v poměru menším než 0,73:1. V ještě další odlišné specifické formě vynálezu popsané níže produkují nové buňky, které jsou předmětem vynálezu, cyklohexyl B2:cyklohexyl B1 avermektiny v poměru menším než 0,68:1. V ještě další odlišné specifické formě vynálezu popsané níže produkují nové buňky, které jsou předmětem vynálezu, cyklohexyl B2:cyklohexyl B1 avermektiny v poměru menším než 0,67:1. V ještě další odlišné specifické formě vynálezu popsané níže produkují nové buňky, které jsou předmětem vynálezu, cyklohexyl B2:cyklohexyl B1 avermektiny v poměru menším než 0,57:1. V ještě další odlišné specifické formě vynálezu popsané níže produkují nové buňky, které jsou předmětem vynálezu, cyklohexyl B2:cyklohexyl B1 avermektiny v poměru menším než 0,53:1. V ještě další odlišné specifické formě vynálezu popsané níže produkují nové buňky, které jsou předmětem vynálezu, cyklohexyl B2:cyklohexyl B1 avermektiny v poměru menším než 0,42:1. V ještě další odlišné specifické formě vynálezu popsané níže produkují nové buňky, které jsou předmětem vynálezu, cyklohexyl B2:cyklohexyl B1 avermektiny v poměru menším než 0,40:1.

V další přednostní formě poskytuje předkládaný vynález nové kmeny *S. avermitilis* zahrnující buňky, které exprimují mutovanou *aveC* alelu, nebo její degenerovanou variantu, nebo genetický konstrukt obsahující *aveC* alelu nebo její degenerovanou variantu na místo nebo navíc k divokému typu alely, kde buňky nového kmene produkují narušená množství avermektinů ve srovnání s buňkami stejného kmene, které exprimují pouze divoký typ *aveC* alely. V přednostní formě vynálezu produkuje nový kmen zvýšená množství avermektinů. V neomezující formě vynálezu zahrnuje genetický konstrukt

silný promotor, jako je například silný konstitutivní promotor *ermE* ze *Sacharopolyspora erythraea* ve směru nahoru a v operačním spojení s *aveC* ORF.

V další přednostní formě poskytuje předkládaný vynález nové kmeny *S. avermitilis* zahrnující buňky, v kterých byl *aveC* gen inaktivován. Takové kmeny jsou užitečné pro rozličné spektrum avermektinů, které produkují ve srovnání s divokým typem kmene i pro komplementaci vyhledávacích analýz, jak je zde popsáno, aby se určilo, zdali cílená nebo náhodná mutagenese *aveC* genu ovlivňuje produkci avermektinů. Ve specifické formě vynálezu popsané níže byly hostitelské buňky *S. avermitilis* geneticky upraveny, aby obsahovaly inaktivovaný *aveC* gen. Například kmen SE180-11 popsaný v příkladech níže byl generován za použití plazmidu pSE180 nahrazujícího gen (ATCC 209605) (Obrázek 3), který byl konstruován, aby inaktivoval *S. avermitilis* *aveC* gen inzercí genu *ermE* rezistence do *aveC* kódující oblasti.

Předkládaný vynález dále poskytuje rekombinantně exprimované mutované *S. avermitilis* *AveC* genové produkty kódované jakoukoli z výše uvedených polynukleotidových molekul, které jsou předmětem vynálezu a způsoby jejich přípravy.

Předkládaný vynález dále poskytuje postup produkce avermektinů zahrnující kultivaci buněk kmene *S. avermitilis*, kteréžto buňky exprimují mutovanou *aveC* alelu, která kóduje genový produkt, který narušuje poměr třídy 2:1 avermektinů produkovaných buňkami *S. avermitilis* exprimujícími mutovanou *aveC* alelu ve srovnání s buňkami stejného kmene, které exprimují pouze divoký typ *aveC* alely, v kultivačním médiu za podmínek, které umožňují nebo indukují produkci avermektinů z těchto buněk. V přednostní formě vynálezu je snížen poměr třídy 2:1 avermektinů produkovaných v kultuře buňkami exprimujícími mutovanou *aveC* alelu. Tento způsob poskytuje

zvýšenou účinnost v produkci komerčně cenných avermektinů, jako je například doramektin.

Předkládaný vynález dále poskytuje postup produkce avermektinů zahrnující kultivaci buněk kmene *S. avermitilis*, kteréžto buňky exprimují mutovanou *aveC* alelu neb genetický konstrukt obsahující *aveC* alelu, která vede k produkci narušeného množství avermektinů produkovaných buňkami kmene *S. avermitilis* exprimujících mutovanou *aveC* alelu nebo genetický konstrukt ve srovnání s buňkami stejného kmene, které neexprimují mutovanou *aveC* alelu nebo genetický konstrukt, ale místo toho exprimují pouze divoký typ *aveC* alely, v kultivačním médiu za podmínek, které umožňují nebo indukují produkci avermektinů z těchto buněk, a získání řečených avermektinů z kultury. V přednostní formě vynálezu je zvýšeno množství avermektinů produkovaných v kultuře buňkami exprimujícími mutovanou *aveC* alelu, degenerovanou variantu nebo genetický konstrukt.

Předkládaný vynález dále poskytuje nový preparát avrmektinů produkovaných kmenem *S. avermitilis* exprimujícím mutovanou *aveC* alelu nebo její degenerovanou variantu, která kóduje genový produkt, který snižuje poměr třídy 2:1 avermektinů produkovaných buňkami kmene *S. avermitilis* exprimujících mutovanou *aveC* alelu nebo její degenerovanou variantu ve srovnání s buňkami stejného kmene, které místo toho exprimují pouze divoký typ *aveC* alely, kde avermektiny v novém preparátu jsou produkovány ve sníženém poměru třídy 2:1 ve srovnání s poměrem třídy 2:1 avermektinů produkovaných buňkami stejného kmene *S. avermitilis*, které místo toho exprimují pouze divoký typ *aveC* alely. Nový avermektinový preparát může být přítomen, jak je produkován ve vyčerpané fermentační kultivační tekutině, nebo z ní může být stažen. Nový avermektinový preparát může být částečně nebo významně purifikován

z kultivační tekutiny pomocí známých biochemických technik purifikace, jako jsou například precipitace amonium sulfátem, dialýza, frakcionace podle velikosti, ionexová chromatografie, HPLC, atd.

5.4. Použití avermektinů

Avermektiny jsou vysoce aktivní antiparazitární látky mající obzvláštní využití jako antihelmintika, ektoparazitocidy, insekticidy a akaricidy. Avermektinové sloučeniny produkované podle způsobů předkládaného vynálezu jsou užitečné pro jakýkoli z těchto účelů. Avermektinové sloučeniny produkované podle předkládaného vynálezu jsou užitečné například k léčbě různých onemocnění či stavů člověka, obzvláště těch, které jsou způsobené parazitickými infekcemi, jak je známo v oboru. Viz například Ikeda a Omura, 1997, Chem. Rev. 97(7):2591-2609. Konkrétněji avermektinové sloučeniny produkované podle předkládaného vynálezu jsou účinné v léčbě celé řady onemocnění nebo stavů způsobených endoparazity, jako jsou například parazitická nematoda, která mohou infikovat člověka, domácí zvířata, prasata, ovce, drůbež, koně nebo dobytek.

Specifičtěji avermektinové sloučeniny produkované podle předkládaného vynálezu jsou účinné nematodům, která infikují člověka, stejně tak jako nematoda, která infikují různé druhy živočichů. Taková nematoda zahrnují gastrointestinální parazity, jako jsou například Ancylostoma, Necator, Ascaris, Strongyloides, Trichinella, Trichuris, Enterobius, Dirofilaria a parazité, které jsou nacházeny v krvi jiných tkání a orgánů, jako jsou například filariální červi a střevní formy Strongyloides a Trichinella.

Avermektinové sloučeniny produkované podle předkládaného vynálezu jsou také účinné v léčbě ektoparazitických infekcí zahrnujících například infestaci savců a ptáků arthropody,

způsobené klíšťaty, roztoči, všemi, blechami, masačkami, bodavým hmazem nebo migrujícími larvami dvoukřídlého hmyzu, které mohou napadnout mezi jinými dobytek a koně.

Avermektinové sloučeniny produkované podle předkládaného vynálezu jsou také užitečné jako insekticidy proti domácím škůdcům, jako jsou například mezi jinými švábi, moli, kobercoví brouci a domácí mouchy, stejně tak jako hmyz napadající uskladněné zrní a zemědělské rostliny, kterýžto škůdci zahrnují mezi jinými roztoče, mšice, housenky a hmyz z rodu Orthoptera, jako jsou například kobylky.

Zvířata, která mohou být léčena avermektinovými sloučeninami produkovanými podle vynálezu, zahrnují ovce, dobytek, jeleny, kozi, prasata, ptáky včetně drůbeže a psi a kočky.

Avermektinová sloučenina produkovaná podle předkládaného vynálezu je podávána v preparátu vhodném pro specifické zamýšlené použití, konkrétní druh hostitelského zvířete, které má být léčeno a parazita či hmyzu, který je infekčním agens. Pro použití jako parazitocidum může být avermektinová sloučenina produkovaná podle předkládaného vynálezu podávána ve formě kapsle, bolu, tablety nebo tekutého léku, nebo může být alternativně podána jako forma polévací, injekční nebo jako implantát. Takové formy jsou připraveny konvenčním způsobem ve shodě se standardní veterinární praxí. Kapsle, bolusy nebo tablety mohou být tedy připraveny smíšením aktivní složky s vhodnou přesně rozdělenou ředící látkou nebo s nosičem, dále obsahujícím dezintegrační látku a/nebo vazebnou látku, jako jsou například škrob, laktóza, talek, magnézium stearát, atd. Namáčecí preparáty mohou být připraveny disperzí aktivní složky ve vodném roztoku spolu s například dispergující nebo zvlhčující látkou. Injekční preparáty mohou být připraveny ve formě sterilního roztoku,

který může obsahovat další substance, jako jsou například dostatečné soli a/nebo glukóza, aby mohl být připraven roztok izotonický s krví.

Takové preparáty se liší vahou aktivní sloučeniny v závislosti na pacientovi, druhu hostitelského zvířete, které má být léčeno, závažnosti a typu infekce a tělesné váhy hostitele. Obecně je pro perorální podání dostatečná dávka aktivní sloučeniny od zhruba 0,001 do 10 mg na kg tělesné váhy pacienta nebo zvířete podané jako jedna dávka nebo rozděleně po dobu od 1 do 5 dnů. Mohou však nastat případy, kde je indikováno vyšší nebo nižší dávkovací rozmezí, jak je určeno například lékařem nebo veterinářem podle klinických příznaků.

Jako alternativa může být avermektinová sloučenina produkována podle předkládaného vynálezu podána v kombinaci s krmivem pro zvířata a pro tento účel může připraveno koncentrované krmivové aditivum nebo premix pro smíšení s normálním krmivem pro zvířata.

Pro použití jako insekticidum a pro léčbu zemědělských škůdců může být avermektinová sloučenina produkována podle předkládaného vynálezu podaná jako sprej, prášek, emulze a podobně ve shodě se standardní zemědělskou praxí.

Příklady provedení vynálezu

6. Fermentace *Streptomyces avermitilis* a analýza B2:B1 avermektinů

Kmeny postrádající aktivitu dehydrogenázy větvených 2-oxo kyselin i 5-O-metyltransfereázy neprodukují žádné avermektiny, pokud fermentační médium není suplementováno mastnými kyselinami. Tento příklad demonstruje, že u takových mutantů může být získáno široké spektrum poměrů B2:B1 avermektinů, je-li fermentace zahájena v přítomnosti různých mastných kyselin.

6.1 Materiál a metodika

Buňky *Streptomyces avermitilis* ATCC 53692 byly skladovány při teplotě -70°C jako plný bujón připravený v očkovacím médiu složeném z: škrobu (Nadex, Laing National) - 20g; Pharmamedia (Trader's Protein, Memphis, TN) - 15 g; Ardamin pH (Yeast Products Inc.) - 5 g; uhličitanu vápenatého - 1 g. Finální objem byl upraven na 1 litr tekoucí vodou, pH bylo upraveno na 7,2 a médium bylo autoklávováno při teplotě 121°C po dobu 25 minut.

K inokulaci nádoby obsahující stejné médium byly použity dva ml rozmražené suspenze výše uvedeného preparátu. Po 48 hodinách inkubace při teplotě 28°C na rotační třepačce při rychlosti 180 rpm, byly použity 2 ml bujónu k inokulaci nádoby obsahující 50 ml produkčního média obsahujícího: škrob - 80 g; uhličitan vápenatý - 7 g; Pharmamedia - 5 g; hydrogen fosfát draselný - 1g; síran hořečnatý - 1 g; kyselina glutamová - 0,6 g; heptahydrát síranu železnatého - 0,01 g; síran zinečnatý - 0,001 g; síran manganatý - 0,001 g. Finální objem byl upraven do 1 litru tekoucí vodou, pH bylo upraveno na 7,2 a médium bylo autoklávováno při teplotě 121°C po dobu 25 minut.

Rozličné substráty karboxylové kyseliny (viz Tabulka 1) byly rozpuštěny v metanolu a přidány do fermentačního bujónu 24 hodin po inokulaci za vzniku finální koncentrace 0,2 g/litr. Fermentační bujón byl inkubován 14 dnů při teplotě 28°C , poté byl bujón zcentrifugován (2500 rpm, po dobu 2 minut) a supernatant byl odstraněn. Mycéliová peleta byla extrahována acetonem (15 ml), poté dichlormetanem (30 ml) a organická fáze byla separována, zfiltrována a poté odpařena do sucha. Reziduum bylo extrahováno do metanolu (1 ml) a analyzováno pomocí HPLC pomocí kapalinového chromatografu Hewlett-Packard 1090A vybaveném skenovacím diode-array detektorem při 240 nm.

Byla použita kolona Beckman Ultrasphere C-18, 5 μ m, 4,6 mm x 25 cm, teplota kolony byla udržována na 40°C. Na kolonu bylo injikováno 25 μ l výše uvedeného metanolickeho roztoku. Eluce byla provedena lineárním gradientem metanol-voda z poměru 80:20 do 95:5 po dobu 40 minut při průtoku 0,85 ml/minutu. Ke kalibraci odpovědi detektoru byly použity dvě standardní koncentrace cyklohexylu B1 a byla měřena plocha pod křivkami B2 a B1 avermektinů.

6.2 Výsedky

HPLC retenční časy pozorované pro B2 a B1 avermektiny a poměry 2:1 jsou uvedeny v Tabulce 1

Tabulka 1

Substrát	HPLC retenční čas (min)		Poměr
	B2	B1	B2:B1
4-Tetrahydropyran karboxylová kyselina	8,1	14,5	0,25
Kyselina izomáselná	10,8	18,9	0,5
Kyselina 3-furoová	7,6	14,6	0,62
Kyselina S-(+)-2-metylmáselná	12,8	21,6	1,0
Kyselina cyklohexankarboxylová	16,9	26,0	1,6
Kyselina 3-thiofenkarboxylová	8,8	16,0	1,8
Kyselina cyklopentankarboxylová	14,2	23,0	2,0
Kyselina 3-trifluorometylmáselná	10,9	18,8	3,9
Kyselina 2-methylpentanoová	14,5	24,9	4,2
Kyselina cykloheptankarboxylová	18,6	29,0	15,0

Data prezentovaná v Tabulce 1 demonstrují extrémně široké rozmezí poměrů B2:B1 avermektinových produktů, což ukazuje na významný rozdíl ve výsledcích dehydratační konverze třídy 2 sloučenin na třídu 1 sloučenin, v závislosti na charakteru postranního řetězce mastné kyseliny dodávané jako iniciační sloučenina. To ukazuje, že změny v poměrech B2:B1, které jsou výsledkem alterací AveC proteinu, mohou být specifické konkrétním substrátům. Následné vyhledávání mutant vykazujících změny v poměru B2:B1 získané s konkrétním

substrátem musí být prováděno v přítomnosti tohoto substrátu. Následné příklady popsané níže používají kyselinu cyklohexankarboxylovou jako substrát pro vyhledávání mutant. Tento substrát je však používán čistě jako příklad potenciálu a není zamýšlen jako omezující použitelnost předkládaného vynálezu.

7. Izolace *aveC* genu

Tento příklad popisuje izolaci a charakterizaci oblasti chromozómu *Streptomyces avermitilis*, který kóduje *AveC* genový produkt. Jak je demonstrováno níže, byl *aveC* gen identifikován jako schopný modifikovat poměr produkovaných cyklohexyl B2 avermektinů na cyklohexyl B1 avermektiny (B2:B1).

7.1. Materiál a metodika

7.1.1. Růst *Streptomyces* pro izolaci DNA

Pro růst *Streptomyces* byla použita následující metoda. Jednotlivé kolonie *S. avermitilis* ATCC 31272 (izolát jednotlivé kolonie č. 2) byly izolovány na poloviční půdě YPD-6 obsahující: Difco kvasničný extrakt - 5 g; Difco Bacto-pepton - 5 g; dextróza - 2,5 g; MOPS - 5 g; Difco Bacto agar - 5 g. Finální objem byl upraven na 1 litr pomocí dH₂O, pH bylo upraveno na 7,0 a médium bylo autoklávováno při teplotě 121°C po dobu 25 minut.

Mycélia vykultivovaná na výše uvedeném médiu byla použita k inokulaci 10 ml TSB média (Difco Tryptic Soy Broth - 30 g, v 1 litru dH₂O, autoklávováno při teplotě 121°C po dobu 25 minut) ve zkumavce o rozměrech 25 x 150 mm, která byla protřepávána (300 rpm) při teplotě 28°C po dobu 48-72 hodin.

7.1.2. Chromozomální DNA izolace ze *Streptomyces*

Alikvóty (0,25 ml nebo 0,5 ml) mycélia vykultivovaného, jak bylo popsáno výše, byly umístěny v 1,5 ml mikrocentrifugačních

zkumavkách a buňky byly zakoncentrovány centrifugací při 12 000 g po dobu 60 sekund. Supernatant byl odstraněn a buňky byly resuspendovány v 0,25 ml TSE pufru (20 ml 1,5 M sacharózy, 2,5 ml 1M Tris-HCl, pH 8,0, 2,5 ml 1M EDTA, pH 8,0 a 75 ml dH₂O) obsahujícím 2 mg/ml lysozymu. Vzorky byly inkubovány při teplotě 37°C po dobu 20 minut při protřepávání, vloženy do automatizovaného zařízení na izolaci nukleových kyselin AutoGen 540™ (Integrated Separation systems, Natick, MA) a genomická DNA byla izolována za použití Cycle 159 (software zařízení) podle instrukcí výrobce.

Alternativně bylo 5 ml mycélia umístěno do zkumavky o rozměrech 17 x 100 mm, buňky byly zakoncentrovány centrifugací při 3000 rpm po dobu 5 minut a supernatant byl odstraněn. Buňky byly resuspendovány v 1 ml TSE pufru, zakoncentrovány centrifugací při 3000 rpm po dobu 5 minut a supernatant byl odstraněn. Buňky byly resuspendovány v 1 ml TSE pufru obsahujícím 2 mg/ml lysozymu a inkubovány při teplotě 37°C při protřepávání po dobu 30-60 minut. Po inkubaci bylo přidáno 0,5 ml 10% dodecyl sulfátu sodného (SDS) a buňky byly inkubovány při teplotě 37°C až do dokončení lýzy. Lyzát byl inkubován při teplotě 65°C po dobu 10 minut, ochlazen na pokojovou teplotu, rozdělen do dvou ependorfech a extrahován 1x 0,5 ml fenol/chloroformem (50% fenol předem ekvilibrovaný 0,5 M Trisem, pH 8,0; 50% chloroform). Vodná fáze byla odstraněna a extrahována 2 až 5 x směsí chloroform:izoamylalkohol (24:1). DNA byla precipitována přidáním 1/10 objemu 3M octanu sodného, pH 4,8, inkubací směsi na ledu 10 minut, centrifugací směsi při 15000 rpm při teplotě 5°C po dobu 10 minut, a vyjmutím supernatantu do čisté zkumavky, do které byl přidán 1 objem izopropanolu. Supernatant plus směs izopropanolu byla poté inkubována na ledu po dobu 20 minut při 5°C, supernatant byl odstraněn a DNA peleta byla promyta 1x 70% etanolem. Po

vysušení pelety byla DNA resuspendována v TE pufru (10 mM Tris, 1 mM EDTA, pH 8,0).

7.1.3. Izolace plazmidové DNA ze *Streptomyces*

Alikvóta (1,0 ml) mycélia byla umístěna do 1,5 ml mikrocentrifugačních zkumavek a buňky byly zakoncentrovány centrifugací při 12000 g po dobu 60 sekund. Supernatant byl odstraněn, buňky byly resuspendovány v 1,0 ml 10,3% sacharóze a zakoncentrovány centrifugací při 12000 g po dobu 60 sekund a supernatant byl odstraněn. Buňky byly poté resuspendovány v 0,25 ml TSE pufru obsahující 2 mg/ml lysozymu a inkubovány při teplotě 37°C po dobu 20 minut při protřepávání a naneseny do automatizovaného zařízení pro izolaci nukleových kyselin AutoGen 540TM. Plazmidová DNA byla izolována za použití softwaru Cycle 106 podle instrukcí výrobce.

Alternativně bylo 1,5 ml mycélia umístěno do 1,5 ml mikrocentrifugačních zkumavek a buňky byly zakoncentrovány centrifugací při 12000 g po dobu 60 sekund. Supernatant byl odstraněn, buňky byly resuspendovány v 1,0 ml 10,3% sacharózy a zakoncentrovány centrifugací při 12000 g po dobu 60 sekund a supernatant byl odstraněn. Buňky byly resuspendovány v 0,5 ml TSE pufru obsahující 2 mg/ml lysozymu a inkubovány při teplotě 37°C po dobu 15-30 minut. Po inkubaci bylo přidáno 0,25 ml alkalického SS (0,3 N NaOH, 2% SDS) a buňky byly inkubovány při teplotě 55°C po dobu 15-30 minut, až byl roztok čistý. K roztoku DNA byl přidán octan sodný (0,1 ml, 3M, pH 4,8) a roztok byl poté inkubován na ledu po dobu 10 minut. Vzorky DNA byly centrifugovány při 14000 rpm po dobu 10 minut při teplotě 5°C. Supernatant byl vyjmut do čisté zkumavky a bylo přidáno 0,2 ml směsi fenol:chloroform (50% fenol:50% chloroform) a směs byla jemně promíchávána. Roztok DNA byl centrifugován při 14000 rpm po dobu 10 minut při teplotě 5°C a vrchní vrstva byla vyjmuta do čisté ependorfký. Byl přidán izopropanol (0,75 ml)

a roztok byl jemně promícháván a poté inkubován při pokojové teplotě po dobu 20 minut. Roztok DNA byl centrifugován při 14000 rpm po dobu 15 minut při teplotě 5°C, supernatant byl odstraněn a DNA peleta byla promyta 70% etanolem, vysušena a resuspendována v TE pufu.

7.1.4. Izolace plazmidové DNA z *E. coli*

Jediná transformovaná kolonie *E. coli* byla inokulována do 5 ml Luria-Bertani (LB) média (Bacto-Trypton - 10 g, Bacto-kvasničný extrakt - 5 g a NaCl - 10 g v 1 litru dH₂O, pH 7,0, autoklávováno při 121°C po dobu 25 minut a suplementováno 100 ug/ml ampicilinu). Kultura byla inkubována přes noc a 1 ml alikvóty byly umístěny do 1,5 ml mikrocentrifugační zkumavky. Vzorky kultury byly nanесeny na automatizované zařízení pro izolaci nukleových kyselin AutoGen 540™ a plazmidová DNA byla izolována za použití softwaru Cycle 106 podle instrukcí výrobce.

7.1.5. Příprava a transformace protoplastů *S. avermitilis*

Jednotlivé kolonie *S. avermitilis* byly izolovány na 1/2 médiu YPD-6. Mycélia byla použita k inokulaci 10 ml média TSB ve zkumavce o rozměrech 25 mm x 150 mm, které bylo poté inkubováno při protřepávání (300 rpm) při teplotě 28°C po dobu 48 hodin. Jeden ml mycélia byl použit k inokulaci 50 ml YEME média. YEME médium obsahuje na jeden litr: Difco kvasničný extrakt - 3 g; Difco Bacto-pepton - 5 g; Difco Mat Extract - 3 g; sacharóza - 300 g. Po autoklávování při teplotě 121°C po dobu 25 minut byly přidány následující substance: 2,5 M MgCl₂ · 6 H₂O (separátně autoklávované při teplotě 11°C po dobu 25 minut) - 2 ml; a glycin (20%) (sterilizace filtrem) - 25 ml.

Mycélia byla kultivována při teplotě 30°C po dobu 48-62 hodin a sbírány centrifugací v 50 ml centrifugční zkumavce (Falcon) při 3000 rpm po dobu 20 minut. Supernatant byl odstraněn a

mycélia byla resuspendována v P pufru, který obsahuje: sacharózu - 205 g; K_2SO_4 - 0,25 g; $MgCl_2 \cdot 6 H_2O$ - 2,02 g; H_2O - 600 ml; K_2PO_4 (0,55) - 10 ml; roztok stopových prvků* - 20 ml; $CaCl_2 \cdot 2H_2O$ (3,68%) - 100 ml; a MES pufr (1,0 M, pH 6,5 - 10 ml. (* Roztok stopových prvků obsahuje na jeden liter: $ZnCl_2$ - 40 mg; $FeCl_3 \cdot 6H_2O$ - 200 mg; $CuCl_2 \cdot 2H_2O$ - 10 mg; $MnCl_2 \cdot 4H_2O$ - 10 mg; $Na_2B_4O_7 \cdot 10H_2O$ - 10 mg; $(NH_4)_6 Mo_7O_{24} \cdot 4H_2O$ - 10 mg). PH bylo upraveno na 6,5, finální objem byl upraven na 1 liter a médium bylo horké zfiltrováno přes 0,45 mikronový filtr.

Mycélia byla zpeletována při 3000 rpm po dobu 20 minut, supernatant byl odstraněn a mycélia byla resuspendována v 20 ml P pufru obsahujícím 2 mg/ml lysozymu. Mycélia byla inkubována při teplotě $35^{\circ}C$ po dobu 16 minut při protřepávání a kontrolována mikroskopicky, aby se určil rozsah tvorby protoplastů. Když byla tvorba protoplastů dokončena, byly protoplasty centrifugovány při 8000 rpm po dobu 10 minut. Supernatant byl odstraněn a protoplasty byly resuspendovány v 10 ml P pufru. Protoplasty byly centrifugovány při 8000 rpm po dobu 10 minut, supernatant byl odstraněn, protoplasty byly resuspendovány ve 2 ml P pufru a přibližně 1×10^9 protoplastů bylo distribuováno do 2,0 ml kryogenních vialek (Nalgene).

Vialka obsahující 1×10^9 protoplastů byla centrifugována při 8000 rpm po dobu 10 minut, supernatant byl odstraněn a protoplasty byly resuspendovány v 0,1 ml P pufru. K protoplastům byly přidány 2 až 5 ug transformující se DNA okamžitě následované přidáním 0,5 ml pracovního T pufru. Základ T pufru obsahoval: PEG-1000 (Sigma)-25 g; sacharózu-2,5 g; H_2O -83 ml. pH bylo upraveno na 8,8 pomocí 1N NaOH (sterilizace filtrací) a základ T pufru byl sterilizován filtrací a uskladněn při $4^{\circ}C$. Pracovní T pufr připravený ve stejný den, kdy byl připraven, se skládal ze základu T pufru- 8,3 ml; K_2PO_4 (4 mM)-1,0 ml; $CaCl_2 \cdot 2H_2O$ (5M)-0,2 ml; a TS (1M,

pH 8) - 0,5 ml. Každá složka pracovního T pufru byla individuálně sterilizována filtrací.

Během 20 sekund přidávání T pufru k protoplastům byl také přidán 1,0 ml P pufru a protoplasty byly centrifugovány při 8000 rpm po dobu 10 minut. Supernatant byl odstraněn a protoplasty byly resuspendovány v 0,1 ml P pufru. Protoplasty byly poté umístěny do RM14 média, které obsahuje: sacharózu-205 g; K_2SO_4 -0,25 g; $MgCl_2 \cdot 6H_2O$ -10,12 g; glukóza 10 g; Difco Casamino kyseliny-0,1 g; Difco kvasničný extrakt-5 g; Difco Oatmeal Agar-3g; Difco Bacto Agar-22 g; dH_2O -800 ml. Roztok byl zautoklávován při teplotě 121° po dobu 25 minut. Po autoklávování byly přidány sterilní zásobní roztoky: K_2PO_4 (0,5%)-10 ml; $CaCl_2 \cdot 2 H_2O$ (5 M); L-prolin (20%)-15 ml; MES pufr (1,0 M, pH 6,5)-10 ml; roztok stopových prvků (stejný jako je uvedeno výše)-2 ml; cykloheximidový zásobní roztok (25 mg/ml-40 ml; a 1 N NaOH-2 ml. Dvacet pět ml média RM14 bylo alikvótně naneseno na destičku a destičky byly vysoušeny 24 hodin před použitím.

Protoplasty byly inkubovány v 95% vlhkosti při teplotě $30^\circ C$ po dobu 20-24 hodin. Pro výběr transformantů rezistentních na thiostrepton byl rovnoměrně rozptýlen 1 ml překryvného pufru obsahujícího 125 ug thiostreptonu na 1 ml na regenerační desičky RM14. Překryvný pufr obsahoval na 100 ml: sacharózu-10,3 g; roztok stopových prvků (stejný jako je uvedeno výše)-0,2 ml; a MES (1M, pH 6,5)-1 ml. Protoplasty byly inkubovány v 95% vlhkosti při teplotě $30^\circ C$ po dobu 7-14 dnů do té doby, než se staly kolonie rezistentní na thiostrepton ($Thio^r$) viditelné.

7.1.6. Transformace protoplastů *Streptomyces lividans*

V některých případech byla použita k transformacím *S. lividans* TK64 (poskytnutá John Innes Institute, Norwich, Spojené království). Způsoby a složení k růstu, tvorbě protoplastů a

transformaci *S. lividans* jsou popsány v publikaci Hopwood et al., 1985, Genetic Manipulation of Streptomyces, A Laboratory Manual, John Innes Foundation, Spojené království, a provedené podle postupů zde popsaných. Plazmidová DNA byla izolována ze *S. lividans*, jak je popsáno v Části 7.1.3. výše.

7.1.7. Fermentační analýza kmenů *S. avermitilis*

Mycélia *S. avermitilis* kultivovaná na 1/2 YPD-6 po dobu 4-7 dnů byla inokulována 1x6 palcových zkumavek obsahujících 8 ml preformovaného média a dvě 5 mm skleněné kuličky. Preformované médium obsahovalo: rozpustný škrob (buďto málo povařený škrob neboli KOSO, Japan Corn Starch Co., Nagoya) - 20 g/l; Pharmamedia-15 g/l; Ardamin pH-5 g/l (Champlain Ind. Clifton, NJ); CaCO_3 -2 g/l; 2xabcfa ("bcfa" znamená mastné kyseliny s větveným řetězcem) obsahující finální koncentraci v médiu 50 ppm 2-(+/-)-metylmáselné kyseliny, 60 ppm izomáselné kyseliny a 20 ppm kyseliny izovalerové. pH bylo upraveno na 7,2 a médium bylo zautoklávováno při teplotě 121°C po dobu 25 minut.

Zkumavka byla protřepávána v úhlu 17° při 215 rpm při teplotě 29°C po dobu 3 dnů. K inokulaci 300 ml Erlenmeyerovy nádoby obsahující 25 ml produkčního média obsahujícího: škrob (buďto málo povařený škrob neboli KOSO) - 160 g/l; Nutrisoy (Archer daniels Midland, Decatur, IL) - 10 g/l; Ardamin pH-10 g/l; K_2HPO_4 -2 g/l; $\text{MgSO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ -2 g/l; $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ -0,02 g/l; MnCl_2 -0,002 g/l; $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ -0,002 g/l; CaCO_3 -14 g/l; 2xabcfa (jako výše); a cyklohexan karboxylovou kyselinu (CHC) vytvořenou jako 20% roztok při pH 7,0) - 800 ppm byla použita 2 ml alikvóta inokulační kultury. pH bylo upraveno na 6,9 a médium bylo zautoklávováno při teplotě 121°C po dobu 25 minut.

Po inokulaci byla nádoba inkubována při teplotě 29°C po dobu 12 dnů s protřepáváním při 200 rpm. Po inkubaci byly 2 ml vzorku odebrány z nádoby, naředěny 8 ml metanolu, smíšeny a směs byla

centrifugována při 1250 g po dobu 10 minut, aby došlo k peletizaci zbytků. Supernatant byl poté analyzován pomocí HPLC za použití kolony Beckam UltraSphere ODS (25 cm x 4,6 mm vnitřní průměr) s průtokem 0,75 ml/min a s detekcí pomocí absorbance při 240 nm. Mobilní fáze byla 86/8,9/5,1 metanol/voda/acetonitril.

7.1.8. Izolace genů *S. avermitilis*

Kosmidová knihovna *S. avermitilis* (ATCC 31272, SC-2) chromozomální DNA byla připravena a hybridizována s ketosyntházovou próbou připravenou z fragmentu genu pro polyketid syntázu (PKS) ze *Saccharopolyspora erythraea*. Detailní popis přípravy kosmidových knihoven může být nalezen v publikaci Sambrook et al., 1989, výše. Detailní popis přípravy chromozomálních DNA knihoven *Streptomyces* je uveden v publikaci Hopwood et al., 1985, výše. Kosmidové klony obsahující ketosyntházu hybridizující oblasti byly identifikovány hybridizací s 2,7 kB Nde/Eco47III fragmentem z pEX26 (laskavě poskytnutým dr. P. Leadlay, Cambridge, Spojené království). Přibližně 5 ng pEX26 bylo natráveno pomocí NdeI a Eco47III. Reakční směs byla nanesena na 0,8% agarózový gel SeaPlaque GTG (FMC BioProducts, Rockland, ME). Po elektroforéze byl vyříznut z gelu 2,7 kB NdeI/Eco47III fragment a DNA byla získána z gelu za použití GELase™ od Epicentre Technologies za použití Fst Protocol. 2,7 kB NdeI/Eco47III fragment byl označen [α -³²]dCTP (deoxycytidin 5'-trifosfát, tetra (trietylamonium) sůl, [α -³²P]-) (NEN-Dupont, Boston, MA) za použití systému BRL Nick Translation System (BRL Life Technologies, Inc., Gaithersburg, MD), podle instrukcí dodavatele. Typická reakce byla provedena v objemu 0,05 ml. Po přidání 5 ul zastavovacího pufru byla označená DNA oddělena od neinkorporovaných nukleotidů za použití G-25 Sephadex Quick Spin™ kolon (Boehringer Mannheim) podle instrukcí dodavatele.

Přibližně 1800 kosmidových klonů bylo prohlíženo hybridizací kolonií. Deset klonů bylo identifikováno jako silně hybridizujících s *Sacc. erythraea* KS próbou. Kolonie *E. coli* obsahující kosmidovou DNA byly kultivovány v LB tekutém médiu a kosmidová DNA byla izolována z každé kultury v automatizovaném zařízení na izolaci nukleových kyselin AutoGen 540™ za použití programu Cycle 3 (software zařízení) podle instrukcí výrobce. Mapování restriční endonukleázou a analýzy Southern blot odhalily, že pět z klonů obsahovalo překrývající se chromozomální oblasti. Genomická BamHI restriční mapa *S. avermitilis* pěti kosmidů (tj. pSE65, pSE66, pSE67, pSE68, pSE69) byla zkonstruována analýzou překrývajících se kosmidů a hybridizací (Obrázek 4).

7.1.9. Identifikace DNA, která moduluje poměry Avermektinů B2:B1 a identifikace aveC ORF

K testování subklonovaných fragmentů odvozených od pSE66 kosmidového klonu byly použity u AveC mutant následující metody na zjištění schopnosti modulace poměrů avermektinů B2:B1. PSE66 (5 ug) byl natráven pomocí SacI a BamHI. Reakční směs byla nanesena na 0,8% agarózový gel SeaPlaque GTG (FMC BioProducts, Rockland, ME), po elektroforéze byl vyříznut z gelu 2,9 kB SacI/BamHI fragment a DNA byla získána z gelu za použití GELase™ (Epicentre Technologies) za použití Fast Protocol. Přibližně 5 ug transportního vektoru pWHM3 (Vara et al., 1989, J Bacteriol 171:5872-5881) bylo natráveno pomocí SacI a BamHI. Okolo 0,5 ug 2,9 Kb inzertu a 0,5 ug natráveného pWHM3 bylo spolu smíšeno a inkubováno přes noc s 1 jednotkou ligázy (New England Biolabs, Inc, Beverly, MA) při teplotě 15°C v celkovém objemu 20 ul podle instrukcí dodavatele. Po inkubaci bylo 5 ul ligační směsi inkubováno při teplotě 70°C po dobu 10 minut, směs byla ochlazená na pokojovou teplotu a použita k transformaci kompetentních *E. coli* DH5α buněk (BRL)

podle instrukcí dodavatele. Plazmidová DNA byla izolována z ampicilin rezistentních transformantů a přítomnost 2,9 kB Sac/BamHI inzertu byla potvrzena restriční analýzou. Plazmid byl označen jako pSE119.

Protoplasty kmene *S. avermitilis* 1100-SC38 (kmen od společnosti Pfizer) byly připraveny a transformovány pomocí pSE119, jak je popsáno v Části 7.1.5 výše. Kmen 1100-SC38 je mutant, který produkuje významně více cyklohexyl-B2 formy avermektinu ve srovnání s cyklohexyl-B1 formou avermektinu, je-li suplementován cyklohexan karboxylovou kyselinou (B2:B1 je zhruba 30:1). PSE119 použitý k transformaci protoplastů *S. avermitilis* byl izolován buďto z kmene *E. coli* GM2163 (získaný od dr. BJ Bachmanna, správce, *E. coli* Genetic Stock Center, Yale University), kmene *E. coli* DM1 (BRL), nebo z kmene *S. lividans* TK64. Thiostrepton rezistentní transformanty kmene 1100-SC38 byly izolovány a analyzovány HPLC analýzou fermentačních produktů. Transformanty kmene *S. avermitilis* 1100-SC38 obsahující pSE119 vedly k narušenému poměru cyklohexyl-B2:cyklohexyl-B1 avermektinů, který byl zhruba 3,7:1 (Tabulka 2).

Po zjištění, že pSE119 je schopný modulovat poměry B2:B1 avermektinů u AveC mutant byla sekvenována inzerovaná DNA. Přibližně 10 ug pSE119 bylo izolováno za pomoci izolačního kitu na plazmidovou DNA (Qiagen, Valencia, CA) podle instrukcí výrobce, a sekvenováno za použití automatizovaného sekvenačního zařízení ABI 373A Automated DNA Sequencer (Perkin Elmer, Foster City, CA). Sekvenační údaje byly seřazeny a editovány za použití programů Genetic Computer Group (GCG, Madison, WI). DNA sekvence a aveC ORF jsou prezentovány na Obrázku 1 (SEQ ID č.1).

Nový plazmid, označený jako pSE118, byl zkonstruován následujícím způsobem. Přibližně 5 ug pSE66 bylo natráveno pomocí SphI a BamHI. Reakční směs byla nanesena na 0,8% agarózový gel SeaPlaque GTG (FMC BioProducts), po elektroforéze byl vyříznut z gelu 2,8 kB SphI/BamHI fragment a DNA byla získána z gelu za použití GELase™ (Epicentre Technologies) za použití Fast Protocol. Přibližně 5 ug transportního vektoru pWHM3 bylo natráveno pomocí SphI a BamHI. Okolo 0,5 ug 2,8 Kb inzertu a 0,5 ug natráveného pWHM3 bylo spolu smíšeno a inkubováno přes noc s 1 jednotkou ligázy (New England Biolabs) při teplotě 15°C v celkovém objemu 20 ul podle instrukcí dodavatele. Po inkubaci bylo 5 ul ligační směsi inkubováno při teplotě 70°C po dobu 10 minut, směs byla ochlazená na pokojovou teplotu a použita k transformaci kompetentních *E. coli* DH5α buněk (BRL) podle instrukcí dodavatele. Plazmidová DNA byla izolována z ampicilin rezistentních transformantů a přítomnost 2,8 kB Sph/BamHI inzertu byla potvrzena restriční analýzou. Plazmid byl označen jako pSE118. Inzerovaná DNA v pSE118 a pSE119 se překrývaly přibližně 838 nukleotidy (Obrázek 4).

Protoplasty kmene *S. avermitilis* 1100-SC38 byly transformovány pomocí pSE118, jak je uvedeno výše. Thiostrepton rezistentní transformanty kmene 1100-SC38 byly izolovány a analyzovány HPLC analýzou fermentačních produktů. Transformanty kmene *S. avermitilis* 1100-SC38 obsahující pSE118 vedly k narušení poměrů cyklohexyl-B2:cyklohexyl-B1 avermektinů ve srovnání s kmenem 1100-SC38 (Tabulka 2).

7.1.10. PCR amplifikace aveC genu z chromozomální DNA *S. avermitilis*

Zhruba 1,2 Kb fragment obsahující aveC ORF byl izolován z chromozomální DNA pomocí PCR amplifikace za použití primerů označených na základě aveC nukleotidové sekvence získané výše.

PCR primery byly dodané společností Genosys Biotechnologies Inc. (Texas). Pravostranný primer byl: 5'-TCACGAAACCGGACACAC-3' (SEQ ID č:6) a levostranný primer byl: 5'-CATGATCGCTGAACCGAG-3' (SEQ ID č:7). PCR reakce byla provedena polymerázou Deep Vent™ (New England Biolabs) v pufru poskytnutém výrobcem a v přítomnosti 300 uM dNTP, 10% glycerolu, 200 pmol každého primeru, 0,1 ug templátu a 2,5 jednotek enzymu ve finálním objemu 100 ul za použití termocykléru Perkin-Elmer Cetus. Termální profil prvního cyklu byl 95°C po dobu 5 minut (denaturační krok), 60°C po dobu 2 minut (chladicí krok) a 72°C po dobu 2 minut (rozšiřovací krok). Následných 24 cyklů mělo stejný termální profil s výjimkou toho, že denaturační krok byl zkrácen na 45 sekund a chladicí krok byl zkrácen na 1 minutu.

PCR produkt byl podroben elektroforéze na 1% agarózovém gelu a byl detekován jeden DNA proužek o velikosti 1,2 Kb. Tato DNA byla purifikována z gelu a ligována s 25 ng linearizovaného, hrubého PCR-Blunt vektoru (Invitrogen) v 1:10 molárním vektor/inzert poměru podle instrukcí výrobce. Ligační směs byla použita k transformaci One Shot™ Competent E. coli buněk (Invitrogen) podle instrukcí výrobce. Plazmidová DNA byla izolována z ampicilin rezistentních transformantů a přítomnost inzertu o velikosti zhruba 1,2 Kb byla potvrzena restrikční analýzou. Plazmid byl označen jako pSE179.

DNA inzertu z pSE179 byla izolována natrávením pomocí BamHI/XbaI, separována elektroforézou, purifikována z gelu a ligována s transportním vektorem pWHM3, který byl natráven pomocí BamHI/XbaI v celkové koncentraci DNA 1 ug v 1:5 molárním vektor/inzert poměru. Ligační směs byla použita k transformaci kompetentních E. coli DH5α buněk (BRL) podle instrukcí dodavatele. Plazmidová DNA byla izolována z ampicilin rezistentních transformantů a přítomnost zhruba

1,2 kB inzertu byla potvrzena restriční analýzou. Plazmid, který byl označen jako pSE186 (Obrázek 2, ATCC 209604), byl transformován do *E. coli* DM1 a plazmidová DNA byla izolována z ampicilin rezistentních transformantů.

7.2. Výsledky

2,9 Kb *SacI*/*BamHI* z pSE119 byl identifikován tak, že po transformaci do kmene *S. avermitilis* 1100-SC38 významně narušil poměr B2:B1 avermektinové produkce. Kmen *S. avermitilis* 1100-SC38 má normální poměr B2:B1 zhruba 30:1, ale je-li transformován vektorem obsahujícím 2,9 Kb *SacI*/*BamHI* fragment, poměr B2:B1 avermektinů se snížil na zhruba 3,7:1. Postfermentační analýza kultur transformantů potvrdila přítomnost transformující DNA.

2,9 Kb pSE119 fragment byl sekvenován a byl identifikován zhruba 0,9 Kb ORF (Obrázek 1) SEQ ID č:1), který zahrnuje *PstI*/*SphI* fragment, který byl předtím jinde mutován, aby produkoval pouze B2 produkty (Ikeda et al., 1995, výše). Srovnání tohoto ORF, nebo jeho odpovídajícího odvozeného polypeptidu proti známým databázím (GenEMBL, SWIS-PROT) neprokázal silnou homologii se známou DNA nebo proteinovou sekvencí.

Tabulka 2 uvádí fermentační analýzu kmene *S. avermitilis* 1100-SC38 transformované různými plazmidy.

Tabulka 2

Kmen <i>S. avermitilis</i> (transformující plazmid)	Počet testovaných transformantů	Průměrný poměr B2:B1
1100-SC38 (žádný)	9	30,66
1100-SC38 (pWHM3)	21	31,3
1100-SC38 (pSE119)	12	3,7
1100-SC38 (pSE119)	12	30,4
1100-SC38 (pSE185)	14	27,9

8. Příklad: Konstrukce mutant AveC *S. avermitilis*

Tento příklad popisuje konstrukci několika různých mutant AveC *S. avermitilis* za použití preparátů a metod zde popsanych. Obecný popis technik pro zavedení mutací do genu *Streptomyces* je popsán Kieserem a Hopwoodem, 1991, Meth Enzym 204:430-458. Detailnější popis je poskytnut Anzaiem et al 1988, J Antibiot XLI(2):226-233 a Stutzman-Engwallem et al., 1992, J. Bacteriol. 174(1):144-154. Tyto reference jsou tímto začleněny v celém svém rozsahu.

8.1 Inaktivace genu *aveC* *S. avermitilis*

AveC mutanty obsahující inaktivované *aveC* geny byly zkonstruovány za použití několika metod, jak je detailně uvedeno níže.

V první metodě byl 640 bp *Sph*/*Pst*I fragment z *aveC* genu v pSE119 (plazmid popsáný v Části 7.1.9 výše) nahrazen genem *ermE* (pro rezistenci na erytromycin) ze *Sacc. Erythraea*. Gen *ermE* byl izolován z pIJ4026 (poskytnutý ústavem John Innes Institute, Norwich, Spojené království, viz také Bibb et al., 1985, Gene 41:357-368) natrávením restrikčním enzymem pomocí *Bg*/II a *Eco*RI s následnou elektroforézou a poté byl z gelu purifikován. Tento zhruba 1,7 Kb fragment byl ligován do pGEM72f (Promega), který byl natráven pomocí *Bam*HI a *Eco*RI a

ligační směs byla transformována do kompetentních *E. coli* DH5 α buněk podle instrukcí výrobce. Plazmidová DNA byla izolována z ampicilin rezistentních transformantů a přítomnost zhruba 1,7 Kb inzertu byla potvrzena restriční analýzou. Plazmid byl označen jako pSE27.

PSE118 (popsaný v Části 7.1.9. výše) byl natráven pomocí *Sph*I a *Bam*HI, natrávený produkt byl podroben elektroforéze a zhruba 2,8 Kb *Sph*I/*Bam*HI inzert byl purifikován z gelu. PSE119 byl natráven pomocí *Pst*I a *Eco*RI, natrávený produkt byl podroben elektroforéze a zhruba 1,5 Kb *Pst*I/*Eco*RI inzert byl purifikován z gelu. Transportní vektor pWHM3 byl natráven pomocí *Bam*HI a *Eco*RI. PSE27 byl natráven pomocí *Pst*I a *Sph*I, natrávený produkt byl podroben elektroforéze a zhruba 1,7 Kb *Pst*I/*Sph*I inzert byl purifikován z gelu. Všechny čtyři fragmenty (tj. zhruba 2,8 Kb, zhruba 1,5 Kb, zhruba 7,2 Kb, zhruba 1,7 Kb) byly spolu ligovány v čtyřcestné ligaci. Ligační směs byla transformována do kompetentních *E. coli* DH5 α buněk podle instrukcí výrobce. Plazmidová DNA byla izolována z ampicilin rezistentních transformantů a přítomnost správného inzertu byla potvrzena restriční analýzou. Plazmid byl označen jako pSE180 (Obrázek 3; ATCC 209605).

PSE180 byl transformován do *S. lividans* TK64 a transformované kolonie byly identifikovány pomocí rezistence k thiostreptonu a erytromycinu. PSE180 byl izolován ze *S. lividans* a použit k transformaci protoplastů *S. avermitilis*. Byly identifikovány čtyři transformanty rezistentní na thiostrepton a protoplasty byly připraveny a umístěny za neselektivních podmínek do RM14 média. Po regeneraci protoplastů byly jednotlivé kolonie prohlíženy na přítomnost rezistence k erytromycinu a nepřítomnost rezistence na thiostrepton, což ukazuje na chromozomální integraci inaktivovaného *aveC* genu a ztrátu volného replikonu. Jeden *Erm*^r *Thio*^s transformant byl

identifikován a označen jako kmen SE180-11, natráven restričními enzymy BamHI, HindIII, PstI, nebo SphI, podroben elektroforéze na 0,8% agarózovém gelu, přenesen na nylonové membrány a hybridizován s *ermE* próbou. Tyto analýzy prokázaly, že chromozomální integrace genu *ermE* rezistence a konkomitantní delece 640 bp PstI/SphI fragmentu se vyskytla v důsledku dvojitého crossoveru. HPLC analýza fermentačních produktů kmene SE180-11 prokázala, že normální avermektiny již nebyly produkovány (Obrázek 5A).

V druhé metodě inaktivace *aveC* genu byl 1,7 Kb *erm* gen odstraněn z chromozómu kmene *S. avermitilis* SE180-11 zanechávající 640 bp PstI/SphI deleci v *aveC* genu. Plazmid pro náhradu genu byl zkonstruován následujícím způsobem: pSE180 byl částečně natráven pomocí XbaI a zhruba 11,4 Kb fragment byl purifikován z gelu. Proužek o velikosti zhruba 11,4 Kb postrádá 1,7 Kb gen pro *ermE* rezistenci. DNA byla poté ligována a transformována do *E. coli* DH5 α buněk. Plazmidová DNA byla izolována z ampicilin rezistentních transformantů a přítomnost správného inzertu byla potvrzena restriční analýzou. Plazmid, který byl označen jako pSE184, byl transformován do *E. coli* DM1 a plazmidová DNA byla izolována z ampicilin rezistentních transformantů. Tento plazmid byl použit k transformaci protoplastů kmene *S. avermitilis* SE180-11. Protoplasty byly připraveny z transformantů kmene SE180-11 rezistentních na thioestrepton a byly umístěny jako jednotlivé kolonie do RM14. Po zregenerování protoplastů byly jednotlivé kolonie prohlíženy na nepřítomnost rezistence na erytromycin i thioestrepton, což ukazuje na chromozomální integraci inaktivovaného *aveC* genu a ztrátu volného replikonu obsahujícího *ermE* gen. Jeden *Erm^s Thio^s* transformant byl identifikován a označen jako SE184-1-13. Fermentační analýza SE184-1-13 prokázala, že normální avermektiny již nebyly

produkovány, a že SE184-1-13 měl stejný fermentační profil jako SE180-11.

V třetím způsobu inaktivace *aveC* genu byl do chromozomálního *aveC* genu začleněn posun rámce přidáním dvou bází G po C v nt pozici 471 za použití PCR, čímž došlo k vytvoření místa BspEI. Přítomnost vytvořeného místa BspEI byla užitečná pro detekci náhrady genu. PCR produkty byly navrženy tak, aby došlo k začlenění frameshift mutace do *aveC* genu a tyto primery byly dodány společností Genosys Biotechnologies, Inc. Pravostranný primer měl sekvenci: 5'-GGTCCGGATGCCGTTCTCG-3' (SEQ ID č:8) a levostranný primer měl sekvenci: 5'-AACTCCGGTCGACTCCCCTTC-3' (SEQ ID č:9). Podmínky PCR byly stejné, jako je posáno v Části 7.1.10. výše. 666 bp PCR produkt byl natráven pomocí SphI za vzniku dvou fragmentů o velikosti 278 bp a 388. Fragment o velikosti 388 bp byl purifikován z gelu.

Plazmid pro náhradu genu byl zkonstruován následujícím způsobem: transportní vektor pWHM3 byl natráven pomocí EcoRI a BamHI. pSE119 byl natráven pomocí BamHI a SphI, natrávená směs byla podrobena elektroforéze a zhruba 840 bp fragment byl purifikován z gelu. PSE119 byl natráven pomocí EcoRI a XmnI, natrávená směs byla podrobena elektroforéze a fragment o velikosti zhruba 1,7 Kb byl purifikován z gelu. Všechny čtyři fragmenty (tj. zhruba 7,2 Kb, zhruba 840 bp, zhruba 1,7 Kb a zhruba 388 bp) byly spolu ligovány v čtyřcestné ligaci. Ligační směs byla transformována do kompetentních *E. coli* DH5α buněk. Plazmidová DNA byla izolována z ampicilin rezistentních transformantů a přítomnost správného inzertu byla potvrzena restriční analýzou a DNA analýzou. Plazmid, který byl označen jako pSE185, byl transmorfován do *E. coli* DM1 a plazmidová DNA byla izolována z ampicilin rezistentních transformantů. Tento plazmid byl použit k transformaci protoplastů kmene *S. avermitilis* 1100-S38. Thiostrepton rezistentní transformanty

kmeny 1100-SC38 byly izolovány a analyzovány HPLC analýzou fermentačních produktů. PSE185 nenarušoval významně poměry B2:B1 avermektinů po transformaci do kmeny *S. avermitilis* 1100-SC38 (Tabulka 2).

PSE185 byl použit k transformaci protoplastů *S. avermitilis* pro tvorbu frameshift mutace v chromozomálním *aveC* genu. Protoplasty byly připraveny z thiostrepton rezistentních transformantů a umístěny jako jednotlivé kolonie do RM14. Po regeneraci protoplastů byly jednotlivé protoplasty prohlíženy na rezistenci k thiostreptonu. Z thiostrepton senzitivních kolonií byla izolována chromozomální DNA, která byla prohlížena pomocí PCR na frameshift mutace integrované do chromozómu. PCR primery byly navrženy na základě *aveC* nukleotidové sekvence a byly dodány společností Genosys Biotechnologies, Inc. (Texas). Pravostranný primer měl sekvenci: 5'-GCAAGGATACGGGGACTAC-3' (SEQ ID č:10) a levostranný primer měl sekvenci: 5'-GAACCGACCGCCTGATAC-3' (SEQ ID č:11). Podmínky PCR byly stejné, jako je popsáno v Části 7.1.10. výše. Získaný PCR produkt měl 543 bp, po natrávení pomocí Bsp byly pozorovány tři fragmenty o velikosti 368 bp, 96 bp a 79 bp, což ukazuje na chromozomální integraci inaktivovaného *aveC* genu a ztrátu volného replikonu.

Fermentační analýza mutant *S. avermitilis* obsahujících frameshift mutaci v *aveC* genu prokázala, že normální avermektiny již nebyly produkovány, a že tyto mutanty měly stejný fermentační HPLC profil jako kmeny SE180-11 a SE184-1-13. Jeden Thio^s transformant byl identifikován a označen jako kmen SE185-5a.

Navíc došlo k tvorbě mutace v *aveC* genu, která mění nt pozici 520 z G na A, která vede k záměně kodónu kódujícího tryptofan (W) v pozici 116 za terminační kodón. Kmen *S. avermitilis*

s touto mutací neprodukoval normální avermektiny a měl stejný fermentační profil jako kmeny SE180-11, SE184-1-13 a SE185-5a.

Navíc došlo k tvorbě mutací v *aveC* genu, které mění: (i) nt pozici 970 z G na A, což mění aminokyselinu v pozici 266 z glycinu (G) na aspartát (D), a (ii) nt pozici 996 z T na C, což mění aminokyselinu v pozici 275 z tyrosinu (Y) na histidin (H). Kmen *S. avermitilis* s těmito mutacemi (G256D/Y275H) neprodukoval normální avermektiny a měl stejný fermentační profil jako kmeny SE180-11, SE184-1-13 a SE185-5a.

Mutované kmeny *S. avermitilis* SE180-11, SE184-1-13, SE185-5a a další zde poskytnuté s inaktivací *aveC*, poskytují vyhledávací nástroj k posouzení dopadu jiných mutací *aveC* genu. PSE186, který obsahuje divokou kopii *aveC* genu, byl transformován do *E. coli* DM1 a plazmidová DNA byla izolována z ampicilin rezistentních transformantů. Tato pSE186 DNA byla použita k transformaci protoplastů kmene *S. avermitilis* SE180-11. Thiostrepton rezistentní transformanty kmene SE180-11 byly izolovány a byla určena přítomnost rezistence k erytromycinu, a $\text{Thio}^r \text{Erm}^r$ transformanty byly analyzovány HPLC analýzou fermentačních produktů. Přítomnost funkčního *aveC* genu *in trans* byla schopna restaurovat normální produkci avermektinů v kmeni SE180-11 (Obrázek 5B).

8.2. Analýza mutací v *aveC* genu, které narušují poměry tříd B2:B1

Jak je popsáno výše, byl kmen *S. avermitilis* SE180-11 obsahující neaktivní *aveC* gen komplementován transformací s plazmidem obsahujícím funkční *aveC* gen (pSE186). Kmen SE180-11 byl také využit jako hostitelský kmen k charakterizaci dalších mutací *aveC* genu, jak je popsáno níže.

Chromozomální DNA byla izolována z kmene 1100-SC38 a použita jako templát pro PCR amplifikaci *aveC* genu. ORF o velikosti 1,2 Kb byl izolován PCR amplifikací za použití primerů navržených na základě *aveC* nukleotidové sekvence. Pravostranný primer měl sekvenci SEQ ID č:6 a levostranný primer měl sekvenci SEQ ID č:7 (viz Část 7.1.10 výše). Podmínky PCR a subklonování byly stejné, jako je popsáno v Části 7.1.10. Analýza DNA sekvence ORF o velikosti 1,2 Kb prokázala mutaci v *aveC* genu, která mění nt pozici 337 z C na T, což mění aminokyselinu v pozici 55 ze serinu (S) na fenylalanin (F). *AveC* gen obsahující mutaci S55F byl subklonován do pWHM3 za vzniku plazmidu, který byl označen jako pSE187, a který byl použit k transformaci protoplastů kmene *S. avermitilis* SE180-11. Thiostrepton rezistentní transformanty kmene SE180-11 byly izolovány, byla určena přítomnost rezistence k erytromycinu a Thio^r Erm^r transformanty byly analyzovány HPLC analýzou fermentačních produktů. Přítomnost *aveC* genu kódujícího záměnu v aminokyselinovém reziduu 55 (S55F) byla schopna restaurovat u kmene SE180-11 normální produkci avermektinů (Obr. 5C); avšak cyklohexyl B2: cyklohexyl B1 poměr byl zhruba 26:1 ve srovnání s kmenem SE180-11 transformovaném pomocí pSE186, který měl poměr B2:B1 zhruba 1,6:1 (Tabulka 3), což ukazuje, že jediná mutace (S55F) moduluje množství produkovaného cyklohexyl-B2 k cyklohexyl-B1.

Další mutace v *aveC* genu byla identifikována, že mění nt pozici 862 z G na A, což vede k záměně aminokyseliny v pozici 230 z glycinu (G) na aspartát (D). Kmen *S. avermitilis* mající tuto mutaci (G230D) produkuje avermektiny v poměru B2:B1 zhruba 30:1.

8.3. Mutace, které redukuje B2:B1 poměr

Některé mutace byly konstruovány, že snižují množství cyklohexyl-B1 následujícím způsobem.

Mutace v *aveC* genu byla identifikována, že mění nt pozici 588 z G na A, což vede k záměně aminokyseliny v pozici 139 z alaninu (A) na threonin (T). *aveC* gen obsahující A139T mutaci byl subklonován do pWHM3 za vzniku plazmidu, který byl označen pSE188, a který byl použit k transformaci protoplastů kmene *S. avermitilis* SE180-11. Thiostrepton rezistentní transformanty kmene SE180-11 byly izolovány, byla určena přítomnost rezistence k erytromycinu a Thio^r Erm^r transformanty byly analyzovány HPLC analýzou fermentačních produktů. Přítomnost mutovaného *aveC* genu kódujícího záměnu v aminokyselinovém reziduu 139 (A139T) byla schopna restaurovat u kmene SE180-11 normální produkci avermektinů (Obr. 5D); avšak B2:B1 poměr byl zhruba 0,94:1, což ukazuje, že tato mutace snižuje množství produkovaného cyklohexyl-B2 k cyklohexyl-B1. Tento výsledek byl neočekávaný, protože publikované výsledky, stejně tak jako výsledky mutací popsaných výše, pouze demonstrovaly buďto inaktivaci *aveC* genu nebo zvýšenou produkci B2 formy avermektinů ve vztahu k B1 formě (Tabulka 3).

Protože A139T mutace narušila poměr B2:B1 v prospěšnějším B1 směru, byla zkonstruována mutace, která kódovala threonin místo serinu v aminokyselinové pozici 138. PSE186 byl tedy natráven pomocí *EcoRI* a klonován do pGEMŠZf (Promega), který byl natráven pomocí *EcoRI*. Plazmid, který byl označen jako pSE186a, byl natráven pomocí *ApaI* a *KpnI*, DNA fragmenty byly separovány na agarózovém gelu a dva fragmenty o velikosti zhruba 3,8 Kb a 0,4 Kb byly purifikovány z gelu. DNA inzert o velikosti zhruba 1,2 Kb z pSE186 byl použit jako PCR templát k založení záměny jediné báze v nt pozici 585. Byly navrženy PCR primery k založení mutace v nt pozici 585, které byly dodány společností Genosys Biotechnologies, Inc. (Texas). Pravostranný primer měl sekvenci: 5'-

GGGGGCGGGCCCCGGGTGCGGAGGCGGAAATGCCCTGGCGACG-3' (SEQ ID č:12); a levostranný primer měl sekvenci: 5'-GGAACCGACCGCCGCCTGATACA-3' (SEQ ID č:13). PCR reakce byla provedena za použití genomického PCR kitu Advantage GC (Clonetechn Laboratories, Palo Alto, CA) v pufru poskytnutém výrobcem, v přítomnosti 200 µM dNTP, 200 pmol každého primeru, 50 ng templátové DNA, 1,0 M GC-Melt a 1 jednotky KlenTaq Polymerase mix ve finálním objemu 50 µl. Termální profil prvního cyklu byl 94°C po dobu 1 minuty, následovaný 25 cykly při teplotě 94°C po dobu 30 sekund a 68°C po dobu 2 minut, a 1 cyklem při teplotě 68°C po dobu 3 minut. PCR produkt o velikosti 295 bp byl natráven pomocí ApaI a KpnI, aby došlo k uvolnění 254 bp fragmentu, který byl podroben elektroforéze a purifikován z gelu. Všechny 3 fragmenty (zhruba 3,8 Kb, 0,4 Kb a 254 bp) byly spolu ligovány v trojcestné ligaci. Ligační směs byla transformována do kompetentních E.coli DH5α buněk. Plazmidová DNA byla izolována z ampicilin rezistentních transformantů a přítomnost správného inzertu byla potvrzena restriční analýzou. Plazmid byl označen jako pSE198.

PSE198 byl natráven pomocí EcoRI, klonován do pWHM3, který byl natráven pomocí EcoRI a transformován do E.coli DH5α buněk. Plazmidová DNA byla izolována z ampicilin rezistentních transformantů a přítomnost správného inzertu byla potvrzena restriční analýzou a analýzou sekvence DNA. Plazmidová DNA byla transformována do E.coli DM1, plazmidová DNA byla izolována z ampicilin rezistentních transformantů a přítomnost správného inzertu byla potvrzena restriční analýzou. Plazmid, který byl označen jako pSE190, byl použit k transformaci protoplastů kmene *S. avermitilis* SE180-11. Thiostrepton rezistentní transformanty kmene SE180-11 byly izolovány, byla určena přítomnost rezistence k erytromycinu a Thio^r Erm^r transformanty byly analyzovány HPLC analýzou fermentačních produktů. Přítomnost mutovaného *aveC* genu kódujícího záměnu v

aminokyselinovém reziduu 138 (S138T) byla schopna restaurovat u kmene SE180-11 normální produkci avermektinů; avšak B2:B1 poměr byl zhruba 0,88:1, což ukazuje, že tato mutace snižuje množství produkovaného cyklohexyl-B2 k cyklohexyl-B1 (Tabulka 3). Tento poměr B2:B1 je dokonce nižší než poměr 0,94:1 pozorovaný u mutace A139T produkované transformací kmene SE180-11 pomocí pSE188, jak je popsáno výše.

Další mutace byla zkonstruována za účelem začlenění threoninu do aminokyselinových pozic 138 i 139. DNA inzert o velikosti zhruba 1,2 Kb z pSE186 byl použit jako PCR templát. Byly navrženy PCR primery k založení mutací v nt pozicích 585 a 588, které byly dodány společností Genosys Biotechnologies, Inc. (Texas). Pravostranný primer měl sekvenci: 5'-GGGGGCGGGCCCGGGTGC GGAGGCGGAAATGCCGCTGGCGACGACC-3' (SEQ ID č:14); a levostranný primer měl sekvenci: 5'-GGAACATCACGGCATTTCACC-3' (SEQ ID č:15). PCR reakce byla provedena za použití podmínek popsaných výše v této části. PCR produkt o velikosti 449 bp byl natráven pomocí ApaI a KpnI, aby došlo k uvolnění 254 bp fragmentu, který byl podroben elektroforéze a purifikován z gelu. PSE186a byl natráven pomocí ApaI a KpnI, DNA fragmenty byly separovány na agarózovém gelu a dva fragmenty o velikosti zhruba 3,8 Kb a 0,4 Kb byly purifikovány z gelu. Všechny 3 fragmenty (zhruba 3,8 Kb, 0,4 Kb a 254 bp) byly spolu ligovány v trojcestné ligaci. Ligační směs byla transformována do kompetentních E.coli DH5α buněk. Plazmidová DNA byla izolována z ampicilin rezistentních transformantů a přítomnost správného inzertu byla potvrzena restrikční analýzou. Plazmid byl označen jako pSE230.

PSE230 byl natráven pomocí EcoRI, naklonován do pWHM3, který byl natráven pomocí EcoRI a transformován do E.coli DH5α buněk. Plazmidová DNA byla izolována z ampicilin rezistentních

transformantů a přítomnost správného inzertu byla potvrzena restrikční analýzou a analýzou sekvence DNA. Plazmidová DNA byla transformována do *E.coli* DM1, plazmidová DNA byla izolována z ampicilin rezistentních transformantů a přítomnost správného inzertu byla potvrzena restrikční analýzou. Plazmid, který byl označen jako pSE231, byl použit k transformaci protoplastů kmene *S. avermitilis* SE180-11. Thiostrepton rezistentní transformanty kmene SE180-11 byly izolovány, byla určena přítomnost rezistence k erytromycinu a Thio^r Erm^r transformanty byly analyzovány HPLC analýzou fermentačních produktů. Přítomnost mutovaného aveC genu kódujícího S138T/A139T byla schopna restaurovat u kmene SE180-11 normální produkci avermektinů; avšak B2:B1 poměr byl zhruba 0,84:1, což ukazuje, že tato mutace dále snižuje množství produkovaného cyklohexyl-B2 k cyklohexyl-B1 (Tabulka 3) ve srovnání se snížením dosaženým transformací kmene SE180-11 pomocí pSE188 nebo pSE199, jak je popsáno výše.

Další mutace byla zkonstruována za účelem dalšího snížení množství produkovaného cyklohexyl B2 k cyklohexyl B1. Protože S138T/A139T mutace narušila poměr B2:B1 v prospěšnějším B1 směru, byla zkonstruována mutace za účelem začlenění threoninu v aminokyselinové pozici 138 a fenylalaninu v aminokyselinové pozici 139. DNA inzert o velikosti zhruba 1,2 Kb z pSE186 byl použit jako PCR templát. Byly navrženy PCR primery k založení mutace v nt pozici 585 (záměna T za A), 588 (záměna G za T) a 589 (záměna C za T), které byly dodány společností Genosys Biotechnologies, Inc. (Texas). Pravostranný primer měl sekvenci: 5'-GGGGGCGGGCCCGGGTGCGGAGGCGGAAATGCCGCTGGCGACGTTC-3' (SEQ ID č:25); a levostranný primer měl sekvenci: 5'-GGAACATCACGGCATTTCACC-3' (SEQ ID č:15). PCR reakce byla provedena za použití genomického PCR kitu Advatnage GC (Clonetech Laboratories, Palo Alto, CA) v pufru poskytnutém výrobcem, v přítomnosti 200 μM dNTP, 200 pmol každého primeru,

50 ng templátové DNA, 1,0 M GC-Melt a 1 jednotky Tth DNA Polymerase ve finálním objemu 50 μ l. Termální profil prvního cyklu byl 94°C po dobu 1 minuty, následovaný 25 cykly při teplotě 94°C po dobu 30 sekund a 68°C po dobu 2 minut, a 1 cyklem při teplotě 68°C po dobu 3 minut. PCR produkt o velikosti 449 bp byl natráven pomocí ApaI a KpnI, aby došlo k uvolnění 254 bp fragmentu, který byl podroben elektroforéze a purifikován z gelu. Všechny 3 fragmenty (zhruba 3,8 Kb, 0,4 Kb a 254 bp) byly spolu ligovány v trojcestné ligaci. Ligační směs byla transformována do kompetentních E.coli DH5 α buněk. Plazmidová DNA byla izolována z ampicilin rezistentních transformantů a přítomnost správného inzertu byla potvrzena restrikční analýzou. Plazmid byl označen jako pSE238.

PSE238 byl natráven pomocí EcoRI, naklonován do pWHM3, který byl natráven pomocí EcoRI a transformován do E.coli DH5 α buněk. Plazmidová DNA byla izolována z ampicilin rezistentních transformantů a přítomnost správného inzertu byla potvrzena restrikční analýzou a analýzou sekvence DNA. Plazmidová DNA byla transformována do E.coli DM1, plazmidová DNA byla izolována z ampicilin rezistentních transformantů a přítomnost správného inzertu byla potvrzena restrikční analýzou. Plazmid, který byl označen jako pSE239, byl použit k transformaci protoplastů kmene S. avermitilis SE180-11. Thiostrepton rezistentní transformanty kmene SE180-11 byly izolovány, byla určena přítomnost rezistence k erytromycinu a Thio^r Erm^r transformanty byly analyzovány HPLC analýzou fermentačních produktů. Přítomnost dvojité mutovaného aveC genu kódujícího S138T/A139F byla schopna restaurovat u kmene SE180-11 normální produkci avermektinů; avšak B2:B1 poměr byl zhruba 0,75:1, což ukazuje, že tato mutace dále snižuje množství produkovaného cyklohexyl-B2 k cyklohexyl-B1 (Tabulka 3) ve srovnání se snížením dosaženým transformací kmene SE180-11 pomocí pSE188, pSE199, nebo pSE231, jak je popsáno výše.

Tabulka 3

Kmen <i>S. avermitilis</i> (transformující plazmid)	n testovaných transformantů	Relativní c B2	Relativní c B1	Průměrný poměr B2:B1
SE180-11 (žádný)	30	0	0	0
SE180-11 (pWHM3)	30	0	0	0
SE180-11 (pSE186)	26	222	140	1,59
SE180-11 (pSE187)	12	283	11	26,3
SE180-11 (pSE188)	24	193	206	0,94
SE180-11 (pSE199)	18	155	171	0,88
SE180-11 (pSE231)	6	259	309	0,84
SE180-11 (pSE239)	20	184	242	0,75

Další mutace byly zkonstruovány za účelem dalšího snížení množství produkovaného cyklohexyl B2 k cyklohexyl B1 za použití techniky DNA přesouvání, jak je popsáno v publikaci Stemmer, 1994, Nature 370:389-391; a Stemmer, 1994, Proc Natl Acad Sci USA 91:10747-10751, a dále v patentech United States Patents 5605793, 5811238, 5830721 a 5837458.

DNA přesouvací plazmidy obsahující mutované *aveC* geny byly transformovány do kompetentních *dam dcm* *E. coli* buněk. Plazmidová DNA byla izolována z ampicilin rezistentních transformantů a použita k transformaci protoplastů kmene SE180-11. Thiostrepton rezistentní transformanty kmene SE180-11 byly izolovány a analyzovány na produkci avermektinů s poměrem cyklohexyl-B2: cyklohexyl-B1 1:1 nebo méně. Byla určena DNA sekvence plazmidové DNA z SE180-11 transformantů produkujících avermektiny s poměrem B2:B1 1:1 nebo méně.

Bylo identifikováno osm transformantů produkujících snížená množství cyklohexyl-B2 k cyklohexyl-B1. Nejnižší poměr B2:B1 dosažený mezi těmito transformanty byl 04:1 (Tabulka 4). Plazmidová DNA byla izolována z každého z osmi transformantů a byla určena DNA sekvence za účelem identifikace mutací v *aveC* genu. Mutace jsou následující.

PSE290 obsahuje 4 nukleotidové mutace v nt pozici 317 z T na A, v nt pozici 353 z C na A, v nt pozici 438 z G na A a v nt pozici 1155 z T na A. Nukleotidová záměna v nt pozici 317 vede k záměně aminokyseliny v pozici 48 z D na E a nukleotidová záměna v nt pozici 438 vede k záměně aminokyseliny v pozici 89 z A na T. Poměr B2:B1 produkovaný buňkami nesoucími tento plazmid byl 0,42:1 (Tabulka 4).

PSE291 obsahuje 4 nukleotidové mutace v nt pozici 272 z G na A, v nt pozici 585 z T na A, v nt pozici 588 z G na A a v nt pozici 708 z G na A. Nukleotidová záměna v nt pozici 585 vede k záměně aminokyseliny v pozici 138 z S na T, nukleotidová záměna v nt pozici 588 vede k záměně aminokyseliny v pozici 139 z A na T a nukleotidová záměna v nt pozici 708 vede k záměně aminokyseliny v pozici 179 z G na S. Poměr B2:B1 produkovaný buňkami nesoucími tento plazmid byl 0,57:1 (Tabulka 4).

PSE292 obsahuje stejné 4 nukleotidové mutace jako pSE290. Poměr B2:B1 produkovaný buňkami nesoucími tento plazmid byl 0,40:1 (Tabulka 4).

PSE293 obsahuje 6 nukleotidových mutací v nt pozici 24 z A na G, v nt pozici 286 z A na C, v nt pozici 497 z T na C, v nt pozici 554 z C na T, v nt pozici 580 z T na C a v nt pozici 886 z A na T. Nukleotidová záměna v nt pozici 286 vede k záměně aminokyseliny v pozici 38 z Q na P, nukleotidová záměna v nt pozici 580 vede k záměně aminokyseliny v pozici 136 z L na P a nukleotidová záměna v nt pozici 886 vede k záměně aminokyseliny v pozici 238 z E na G. Poměr B2:B1 produkovaný buňkami nesoucími tento plazmid byl 0,68:1 (Tabulka 4).

PSE294 obsahuje 6 nukleotidových mutací v nt pozici 469 z T na C, v nt pozici 585 z T na A, v nt pozici 588 z G na A, v nt pozici 708 z G na A, v nt pozici 833 z C na T a v nt pozici 1184 z G na A. Navíc jsou nukleotidy v pozicích 173, 174 a 175 deletovány. Nukleotidová záměna v nt pozici 469 vede k záměně aminokyseliny v pozici 99 z F na S, nukleotidová záměna v nt pozici 585 vede k záměně aminokyseliny v pozici 138 z S na T, nukleotidová záměna v nt pozici 588 vede k záměně aminokyseliny v pozici 139 z A na T a nukleotidová záměna v nt pozici 708 vede k záměně aminokyseliny v pozici 179 z G na S. Poměr B2:B1 produkovaný buňkami nesoucími tento plazmid byl 0,53:1 (Tabulka 4).

PSE295 obsahuje 2 nukleotidové mutace v nt pozici 588 z G na A a v nt pozici 856 z T na C. Nukleotidová záměna v nt pozici 588 vede k záměně aminokyseliny v pozici 139 z A na T a nukleotidová záměna v nt pozici 856 vede k záměně aminokyseliny v pozici 228 z M na T. Poměr B2:B1 produkovaný buňkami nesoucími tento plazmid byl 0,80:1 (Tabulka 4).

PSE296 obsahuje 5 nukleotidových mutací v nt pozici 155 z T na C, v nt pozici 505 z G na T, v nt pozici 1039 z C na T, v nt pozici 1202 z C na T a v nt pozici 1210 z T na C. Nukleotidová záměna v nt pozici 505 vede k záměně aminokyseliny v pozici 111 z G na V a nukleotidová záměna v nt pozici 1039 vede k záměně aminokyseliny v pozici 289 z P na L. Poměr B2:B1 produkovaný buňkami nesoucími tento plazmid byl 0,73:1 (Tabulka 4).

PSE297 obsahuje 4 nukleotidové mutace v nt pozici 377 z G na T, v nt pozici 588 z G na A, v nt pozici 633 z A na G, v nt pozici 1067 z A na T. Nukleotidová záměna v nt pozici 588 vede k záměně aminokyseliny v pozici 139 z A na T, nukleotidová záměna v nt pozici 633 vede k záměně aminokyseliny v pozici

154 z K na E, nukleotidová záměna v nt pozici 1067 vede k záměně aminokyseliny v pozici 298 z Q na H. Poměr B2:B1 produkovaný buňkami nesoucími tento plazmid byl 0,67:1 (Tabulka 4).

Tabulka 4

Kmen <i>S. avermitilis</i> (transformující plazmid)	n testovaných transformantů	Relativní c B2	Relativní c B1	Průměrný poměr B2:B1
SE180-11 (žádný)	4	0	0	0
SE180-11 (pWHM3)	4	0	0	0
SE180-11 (pSE290)	4	87	208	0,42
SE180-11 (pSE291)	4	106	185	0,57
SE180-11 (pSE292)	4	91	231	0,40
SE180-11 (pSE293)	4	123	180	0,68
SE180-11 (pSE294)	4	68	129	0,53
SE180-11 (pSE295)	4	217	271	0,80
SE180-11 (pSE296)	1	135	186	0,73
SE180-11 (pSE297)	1	148	221	0,67

9. Konstrukce 5' delečních mutant

Jak je vysvětleno v Části 5.1 výše, obsahuje nukleotidová sekvence *S. avermitilis* uvedená na Obrázku 1 (SEQ ID č:1) čtyři různé GTG kodóny v bp pozicích 42, 174, 177 a 180, které jsou potenciálními startovacími místy. Tato část popisuje konstrukci mnohočetných delecí 5' oblasti *aveC* ORF (Obrázek 1; SEQ ID č:1), aby se definovalo, který z těchto kodónů může účinkovat jako startovací místo v *aveC* ORF pro expresi proteinu.

Fragmenty *aveC* genu různě deletované na 5' konci byly izolovány z chromozomální DNA *S. avermitilis* pomocí PCR amplifikace. PCR primery byly navrženy na základě *aveC* DNA sekvence a byly dodány společností Genosys Biotechnologies, Inc. Pravostranné primery měly sekvenci: 5' - AACCCATCCGAGCCGCTC-3' (SEQ ID č:16) (D1F1); 5' - TCGGCCTGCCAACGAAC-3' (SEQ ID č:17) (D1F2); 5' - CCAACGAACGTGTAGTAG-3' (SEQ ID č:18) (D1F3); a 5' - TGCAGGCGTACGTGTTTCAGC-3' (SEQ ID č:19) (D2F2). Levostranné

primery měly sekvenci: 5'-CATGATCGCTGAACCGA-3' (SEQ ID č:20); 5'-CATGATCGCTGAACCGAGGA-3' (SEQ ID č:21); a 5'-AGGAGTGTGGTGGTCTCTGGA-3' (SEQ ID č:22). PCR reakce byla provedena, jak je popsáno v Části 8,3 výše.

PCR produkty byly separovány elektroforeticky na 1% agarózovém gelu a byly detekovány jednotlivé DNA bandy o velikosti buďto zhruba 1,0 Kb nebo 1,1 Kb. PCR produkty byly purifikovány z gelu a ligovány s 25 ng linearizovaného pCR2.1 vektoru (Invitrogen) v 1:10 molárním vektor/inzert poměru podle instrukcí výrobce. Ligační směsi byly použity k transformaci One Shot™ kompetentních *E. coli* buněk (Invitrogen) podle instrukcí výrobce. Plazmidová DNA byla izolována z ampicilin rezistentních transformantů a přítomnost inzertu byla potvrzena restriční analýzou a analýzou sekvence DNA. Tyto plazmidy byly označeny jako pSE190 (získán s primerem D1F1), pSE191 (získán s primerem D1F2), pSE192 (získán s primerem D1F3) a pSE193 (získán s primerem D2F2).

DNA inzerty byly natráveny pomocí BamHI/XbaI, separovány elektroforeticky na 1% agarózovém gelu, a odděleně ligovány s transportním vektorem pWHM3, který byl natráven pomocí BamHI/XbaI v celkové DNA koncentraci 1 ug v 1:5 molárním vektor/inzert poměru. Ligační směsi byly použity k transformaci kompetentních *E. coli* DH5α buněk. Plazmidová DNA byla izolována z ampicilin rezistentních transformantů a přítomnost inzertu byla potvrzena restriční analýzou. Tyto plazmidy, které byly označeny jako pSE194 (D1F1), pSE195 (D1F2), pSE196 (D1F3) a pSE197 (D2F2) byly každý odděleně transformovány do kmene *E. coli* DM1, plazmidová DNA byla izolována z ampicilin rezistentních transformantů a přítomnost inzertu byla potvrzena restriční analýzou. Tato DNA byla použita k transformaci protoplastů kmene *S. avermitilis* SE180-11. Thiostrepton rezistentní transformanty kmene SE180-11 byly

izolovány, byla určena přítomnost rezistence k erytromycinu, a Thio^r Erm^r transformanty byly analyzovány HPLC analýzou fermentačních produktů za účelem určení, která GTG místa byla nezbytná pro *aveC* expresi. Výsledky ukazují, že GTG kodón v pozici 42 může být eliminován bez ovlivnění *aveC* exprese, protože pSE194, pSE195 a pSE196, z nichž každý postrádá GTG místo v pozici 42, ale každý obsahuje tři GTG místa v pozicích 174, 177 a 180, byly všechny schopny restaurovat normální produkci avermektinů po transformaci do SE180-11. Normální produkce avermektinů nebyla restaurována transformací kmene SE180-11 pomocí pSE197, který postrádá všechny čtyři GTG místa (Tabulka 5).

Tabulka 5

Kmen <i>S. avermitilis</i> (transformující plazmid)	n testovaných transformantů	Relativní c B2	Relativní c B1	Průměrný poměr B2:B1
SE180-11 (žádný)	6	0	0	0
SE180-11 (pWHM3)	6	0	0	0
SE180-11 (pSE186)	6	241	152	1,58
SE180-11 (pSE194)	6	35	15	2,43
SE180-11 (pSE195)	6	74	38	1,97
SE180-11 (pSE196)	6	328	208	1,58
SE180-11 (pSE197)	6	0	0	0

10. Klonování *aveC* homologu ze *S. hygroscopicus* a *S. griseochromogenes*

Předkládaný vynález umožňuje identifikovat a klonovat *aveC* homologní geny z jiných avermektin nebo milbemycin produkujících druhů *Streptomyces*. Například byla hybridizována s 1,2 Kb *aveC* próbou ze *S. avermitilis* kosmidová knihovna genomické DNA ze *S. hygroscopicus* (FERM BP-1901), jak je popsáno výše. Bylo identifikováno několik kosmidových klonů, které silně hybridizují. Chromozomální DNA byla izolována z těchto kosmidů a byl identifikován 4,9 Kb KpnI fragment, který hybridizoval s *aveC* próbou. Tato DNA byla sekvenována a byl identifikován ORF (SEQ ID č:3) mající významnou homologii s *aveC* ORF *S. avermitilis*. Aminokyselinová sekvence (SEQ ID

č:4) odvozená z aveC homologního ORF *S. hygroscopicus* je uvedená na Obrázku 6.

Navíc byla hybridizována s 1,2 Kb aveC próbou ze *S. avermitilis* kosmidová knihovna genomické DNA ze *S. griseochromogenes*, jak je popsáno výše. Bylo identifikováno několik kosmidových klonů, které silně hybridizují. Chromozomální DNA byla izolována z těchto kosmidů a byl identifikován 5,4 Kb PstI fragment, který hybridizoval s aveC próbou. Tato DNA byla sekvenována a byl identifikován aveC homologní částečný ORF mající významnou homologii s aveC ORF *S. avermitilis*. Odvozená částečná aminokyselinová sekvence (SEQ ID č:5) je uvedená na Obrázku 6.

DNA a aminokyselinová sekvenční analýza aveC homologu ze *S. hygroscopicus* a *S. griseochromogenes* ukazují, že tyto oblasti sdlejí významnou homologii (zhruba 50% sekvenční identita na aminokyselinové úrovni), jak vůči sobě tak i s genovými produkty aveC ORF *S. avermitilis* a AveC (Obrázek 6).

11. Konstrukce plazmidu s aveC genem za ermE promoterem

1,2 Kb aveC ORF z pSE186 byl subklonován v pSE34, což je transportní vektor pWHM3 mající 300 bp ermE promóter inzerovaný jako KpnI/BamHI fragment v KpnI/BamHI místě pWHM3 (viz Ward et al., 1986, Mol Gen Genet 203:468-478). PSE186 byl natráven pomocí BamHI a HindIII, natrávená směs byla podrobena elektroforéze a 1,2 Kb fragment byl izolován z agarózového gelu a ligován s pSE34, který byl natráven pomocí BamHI a HindIII. Ligační směs byla transformována do kompetentních *E. coli* DH5α buněk podle instrukcí výrobce. Plazmidová DNA byla izolována z ampicilin rezistentních transformantů a přítomnost 1,2 Kb inzertu byla potvrzena restrikční analýzou. Tento plazmid, který byl označen jako pSE189 byl transformován do kmene *E. coli* DM1 a plazmidová DNA byla izolována z ampicilin

rezistentních transformantů. Protoplasty kmene *S. avermitilis* 1100-SC38 byly transformovány pomocí pSE189. Thiostrepton rezistentní transformanty kmene 1100-SC38 byly izolovány a analyzovány HPLC analýzou fermentačních produktů.

Transformanty kmene 1100-SC38 obsahující pSE189 měly narušené poměry produkovaných avermektin cyklohexyl-B2:avermektin-B1 (zhruba 3:1) ve srovnání s kmenem 1100-SC38 (zhruba 34:1) a celková produkce avermektinů se zvýšila přibližně 2,4 krát ve srovnání s kmenem 1100-SC38 transformovaným pomocí pSE119 (Tabulka 6).

PSE189 byla také transformována do protoplastů divokého typu kmene *S. avermitilis*. Thiostrepton rezistentní transformanty byly izolovány a analyzovány HPLC analýzou fermentačních produktů. Celkové avermektiny produkované divokým typem *S. avermitilis* transformovaným pomocí pSE189 se zvýšily přibližně 2,2 krát ve srovnání s divokým kmenem *S. avermitilis* transformovaným pomocí pSE119 (Tabulka 6).

Tabulka 6

Kmen <i>S. avermitilis</i> (transformující plazmid)	n testovaných transformantů	Relativní B2	Relativní B1	Relativní celkové avermektiny	Průměrný poměr B2:B1
1100-SC38	6	155	4,8	176	33,9
1100-SC38 (pSE119)	9	239	50,3	357	4,7
1100-SC38 (pSE189)	16	546	166	849	3,3
Divoký typ	6	59	42	113	1,41
Divoký typ (pSE119)	6	248	151	481	1,64
Divoký typ (pSE189)	5	545	345	1,071	1,58

12. Chimerický plazmid obsahující sekvenční z aveC ORF *S. avermitilis* i aveC homologa *S. hygroscopicus*

Hybridní plazmid označený jako pSE350 byl zkonstruován, aby obsahoval 564 bp část aveC homologu *S. hygroscopicus*

nahrazující 564 homologní část *aveC* ORF *S. avermitilis* (Obrázek 7) následujícím způsobem. PSE350 byl zkonstruován za použití *Bsa*AI restrikčního místa, které je konzervováno v obou sekvencích (*aveC* pozice 225) a *Kpn*I restrikčním místě, které je přítomno v *aveC* genu *S. avermitilis* (*aveC* pozice 810). *Kpn*I místo bylo začleněno do DNA *S. hygroscopicus* pomocí PCR za použití pravostranného primeru 5'-CTTCAGGTGTACGTGTTCG-3' (SEQ ID č:23) a levostranného primeru 5'-GAAGTGGTACCACTGCCCC-3' (SEQ ID č:24) (dodané společností Genosys Biotechnologies) za použití PCR podmínek popsaných v Části 7.1.10 výše. PCR produkt byl natráven pomocí *Bsa*AI a *Kpn*I, fragmenty byly separovány na 1% agarózovém gelu a 564 bp *Bsa*AI/*Kpn*I fragment byl izolován z gelu. pSE179 (popsaný v Části 7.1.10 výše) byl natráven pomocí *Kpn*I a *Hind*III, fragmenty byly separovány elektroforeticky na 1% agarózovém gelu a fragment o velikosti zhruba 4,5 Kb byl izolován z gelu. pSE179 byl natráven pomocí *Hind*III a *Bsa*AI, fragmenty byly separovány elektroforeticky na 1% agarózovém gelu a *Bsa*AI/*Hind*III fragment o velikosti zhruba 0,2 Kb byl izolován z gelu. *Hind*III/*Kpn*I fragment o velikosti zhruba 4,5 Kb, *Bsa*AI/*Hind*III fragment o velikosti zhruba 0,2 Kb a *Bsa*AI/*Kpn*I fragment o velikosti zhruba 564 bp ze *S. hygroscopicus* byly spolu ligovány v trojcestné ligaci a ligační směs byla transformována do kompetentních *E.coli* DH5α buněk. Plazmidová DNA byla izolována z ampicilin rezistentních transformantů a přítomnost správného inzertu byla potvrzena restrikční analýzou za použití *Kpn*I a *Ava*I. Plazmid byl natráven pomocí *Hind*III a *Xba*I, aby došlo k uvolnění inzertu o velikosti 1,2 Kb, který byl poté ligován s pWHM3, který byl natráven pomocí *Hind*III a *Xba*I. Ligační směs byla transformována do kompetentních *E.coli* DH5α buněk. Plazmidová DNA byla izolována z ampicilin rezistentních transformantů a přítomnost správného inzertu byla potvrzena restrikční analýzou za použití *Hind*III a *Ava*I. Plazmidová DNA byla transformována do *E.coli* DM1, plazmidová DNA byla izolována

z ampicilin rezistentních transformantů a přítomnost správného inzertu byla potvrzena restrikční analýzou a analýzou sekvence DNA. Plazmid byl označen jako pSE350 a použit k transformaci protoplastů kmene SE180-11 *S. avermitilis*. Thiostrepton rezistentní transformanty kmene SE180-11 byly izolovány, byla určena přítomnost rezistence k erytromycinu, a Thio^r Erm^r transformanty byly analyzovány HPLC analýzou fermentačních produktů. Výsledky ukazují, že transformanty obsahující *S. avermitilis*/*S. hygrosopicus* hybridní plazmid mají průměrný B2:B1 poměr zhruba 109:1 (Tabulka 7).

Tabulka 7

Kmen <i>S. avermitilis</i> (transformující plazmid)	n testovaných transformantů	Relativní c B2	Relativní c B1	Průměrný poměr B2:B1
SE180-11 (žádný)	8	0	0	0
SE180-11 (pWHM3)	8	0	0	0
SE180-11 (pSE350)	16	233	2	109

Uložení biologického materiálu

Následující biologický materiál byl uložen v Americké sbírce typových kultur (ATCC), Parklawn Drive, Rockville, MD, 20852, USA, 29. ledna 1998 a byly mu přiřazeny následující přístupová čísla:

<u>Plazmid</u>	<u>Přístupové číslo</u>
Plazmid pSE180	209605
Plazmid pSE186	209604

Všechny patenty, patentové přihlášky a publikace výše citované jsou tímto začleněny jako reference v celé své šíři.

Předkládaný vynález není omezen rozsahem specifických forem vynálezu zde popsanych, které jsou zamýšleny jako jednotlivé ilustrace jednotlivých aspektů vynálezu a funkčně ekvivalentní metody a komponenty jsou v rozsahu vynálezu. Různé modifikace

vynálezu, navíc k těm, které byly uvedeny a popsány, budou skutečně zjevné osobám znalým oboru z předchozího popisu a doprovodných obrázků. Takové modifikace jsou považovány za patřící do rozsahu přiložených patentových nároků.

PATENTOVÉ NÁROKY

1. Polynukleotidová molekula obsahující nukleotidovou sekvenci aveC alely *Streptomyces avermitilis*, nebo AveC genový produkt-kódující sekvenci plazmidu pSE186 (ATCC 209604), nebo nukleotidovou sekvenci aveC ORF *S. avermitilis*, jak je uvedeno na Obrázku 1 (SEQ ID č. 1), nebo její degenerovanou variantu, ale kterážto nukleotidová sekvence dále obsahuje alespoň první mutaci kódující aminokyselinovou substituci ze serinu na threonin v aminokyselinovém reziduu aveC genového produktu korespondujícím s aminokyselinovou pozicí 138 v SEQ ID č. 2, a druhou mutaci kódující aminokyselinovou substituci z alaninu na fenylalanin v aminokyselinovém reziduu aveC genového produktu korespondujícím s aminokyselinovou pozicí 139 v SEQ ID č. 2, takže buňky kmene *S. avermitilis* ATCC 53692, v kterých byla divoká aveC alela inaktivována, a které exprimují polynukleotidovou molekulu obsahující mutovanou nukleotidovou sekvenci, produkují poměr třídy 2:1 avermektinů, který je snížen ve srovnání s poměrem třídy 2:1 avermektinů produkovaným buňkami kmene *S. avermitilis* ATCC 53692, který exprimuje pouze divoký typ aveC alely.
2. Polynukleotidová molekula podle patentového nároku 1, kde třídou 2:1 avermektinů jsou cyklohexyl B2:cyklohexyl B1 avermektiny.
3. Polynukleotidová molekula podle patentového nároku 2, kde snížený poměr cyklohexyl B2:cyklohexyl B1 avermektinů je 0,75:1 nebo méně.
4. Rekombinantní vektor obsahující polnukleotidovou molekulu podle patentového nároku 1.
5. Rekombinantní vektor schopný mutovat aveC alelu *Streptomyces avermitilis* začleněním alespoň první mutace kódující aminokyselinovou substituci ze serinu na

threonin v aminokyselinovém reziduu aveC genového produktu korespondujícím s aminokyselinovou pozicí 138 v SEQ ID č. 2, a druhé mutace kódující aminokyselinovou substituci z alaninu na fenylalanin v aminokyselinovém reziduu aveC genového produktu korespondujícím s aminokyselinovou pozicí 139 v SEQ ID č. 2, obsahující polynukleotidovou molekulu mající nukleotidovou sekvenci kódující takovou mutaci.

6. Rekombinantní vektor podle patentového nároku 5 obsahující polnukleotidovou molekulu podle patentového nároku 1.
7. Hostitelská buňka *Streptomyces* obsahující polnukleotidovou molekulu podle patentového nároku 1 nebo rekombinantní vektor podle patentového nároku 4 nebo 5.
8. Způsob přípravy nového kmene *S. avermitilis* zahrnující buňky, které exprimují mutovanou aveC alelu. Která produkuje snížený poměr 2:1 avermektinů ve srovnání s buňkami stejného kmene *S. avermitilis*, který exprimuje pouze divoký typ aveC alely, kterýžto způsob zahrnuje:
(a) vložení polynukleotidové molekuly do buňky kmene *S. avermitilis*, kterážto polynukleotidová molekula nese mutovanou aveC alelu nebo její degenerovanou variantu, která kóduje AveC genový produkt obsahující alespoň první mutaci kódující aminokyselinovou substituci ze serinu na threonin v aminokyselinovém reziduu aveC genového produktu korespondujícím s aminokyselinovou pozicí 138 v SEQ ID č. 2, a druhou mutaci kódující aminokyselinovou substituci z alaninu na fenylalanin v aminokyselinovém reziduu aveC genového produktu korespondujícím s aminokyselinovou pozicí 139 v SEQ ID č. 2, kde exprese řečeného genového produktu vede ke snížení poměru třídy 2:1 avermektinů produkovaného buňkami kmene *S. avermitilis* exprimujícími mutovanou aveC alelu nebo její degenerovanou variantu, ve srovnání s buňkami stejného

kmene *S. avermitilis*, který exprimuje pouze divoký typ *aveC* alely a výběr buněk, které produkují avermektiny ve sníženém poměru třídy 2:1 produkovaném buňkami kmene, který exprimuje pouze divoký typ *aveC* alely; (b) vložení jedné nebo více polynukleotidových molekul do buňky kmene *S. avermitilis*, kteréžto polynukleotidové molekuly jsou schopné způsobit jednu nebo více mutací v *aveC* alele, takže buňky kódují *AveC* genový produkt obsahující alespoň první aminokyselinovou substituci ze serinu na threonin v aminokyselinovém reziduu korespondujícím s aminokyselinovou pozicí 138 v SEQ ID č. 2, a druhou aminokyselinovou substituci z alaninu na fenylalanin v aminokyselinovém reziduu korespondujícím s aminokyselinovou pozicí 139 v SEQ ID č. 2, kde exprese řečeného genového produktu vede ke snížení poměru třídy 2:1 avermektinů produkovaného buňkami kmene *S. avermitilis* exprimujícími mutovanou *aveC* alelu ve srovnání s buňkami stejného kmene *S. avermitilis*, který exprimuje pouze divoký typ *aveC* alely, a výběr buněk, které produkují avermektiny ve sníženém poměru třídy 2:1 produkovaném buňkami kmene, který exprimuje pouze divoký typ *aveC* alely.

9. Způsob podle patentového nároku 8, kde třídou 2:1 avermektinů jsou cyklohexyl B2:cyklohexyl B1 avermektiny.
10. Způsob podle patentového nároku 9, kde snížený poměr cyklohexyl B2:cyklohexyl B1 avermektinů je 0,75 nebo méně.
11. Buňka *Streptomyces avermitilis* obsahující mutovanou *aveC* alelu obsahující první mutaci kódující aminokyselinovou substituci ze serinu na threonin v aminokyselinovém reziduu korespondujícím s aminokyselinovou pozicí 138 v SEQ ID č. 2, a druhou mutaci kódující aminokyselinovou substituci z alaninu na fenylalanin v aminokyselinovém

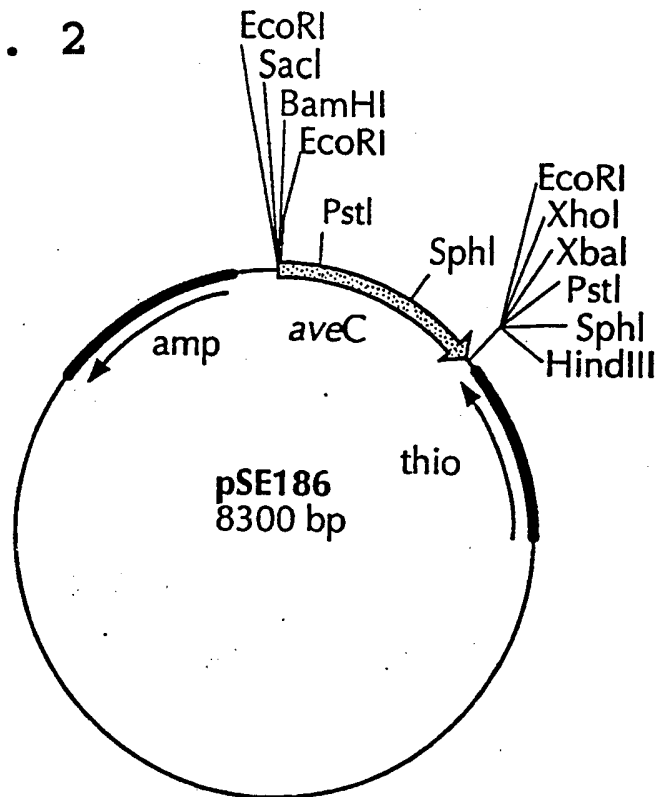
- reziduu korespondujícím s aminokyselinovou pozicí 139 v SEQ ID č. 2.
12. Buňka podle patentového nároku 11, které produkuje snížený poměr třídy 2:1 avermektinů ve srovnání s buňkami stejného kmene *S. avermitilis*, který exprimuje pouze divoký typ *aveC* alely.
 13. Buňka podle patentového nároku 12, kde třídou 2:1 avermektinů jsou cyklohexyl B2:cyklohexyl B1 avermektiny.
 14. Buňka podle patentového nároku 13, kde snížený poměr cyklohexyl B2:cyklohexyl B1 avermektinů je 0,75:1 nebo méně.
 15. Postup produkce avermektinů zahrnující kultivaci buněk podle patentového nároku 11 v kultivačním médiu za podmínek, které umožňují nebo indukují produkci avermektinů, a získání řečených avermektinů z kultury.
 16. Složení cyklohexyl B2:cyklohexyl B1 avermektinů produkovaných buňkami *Streptomyces avermitilis* zahrnující cyklohexyl B2:cyklohexyl B1 avermektiny v poměru 0,75:1 nebo méně v médiu, v kterém byly buňky kultivovány.
 17. Složení cyklohexyl B2:cyklohexyl B1 avermektinů produkovaných buňkami kmene *Streptomyces avermitilis*, který exprimuje mutovanou *aveC* alelu, která kóduje genový produkt, který vede ke snížení poměru třídy 2:1 cyklohexyl B2:cyklohexyl B1 avermektinů produkovaného buňkami ve srovnání s buňkami stejného kmene *S. avermitilis*, který neexprimuje mutovanou *aveC* alelu, ale exprimuje pouze divoký typ *aveC* alely, kteréžto složení zahrnuje cyklohexyl B2:cyklohexyl B1 avermektiny v poměru 0,75:1 nebo méně v kultivačním médiu, v kterém byly buňky kultivovány.

702002-297
38842

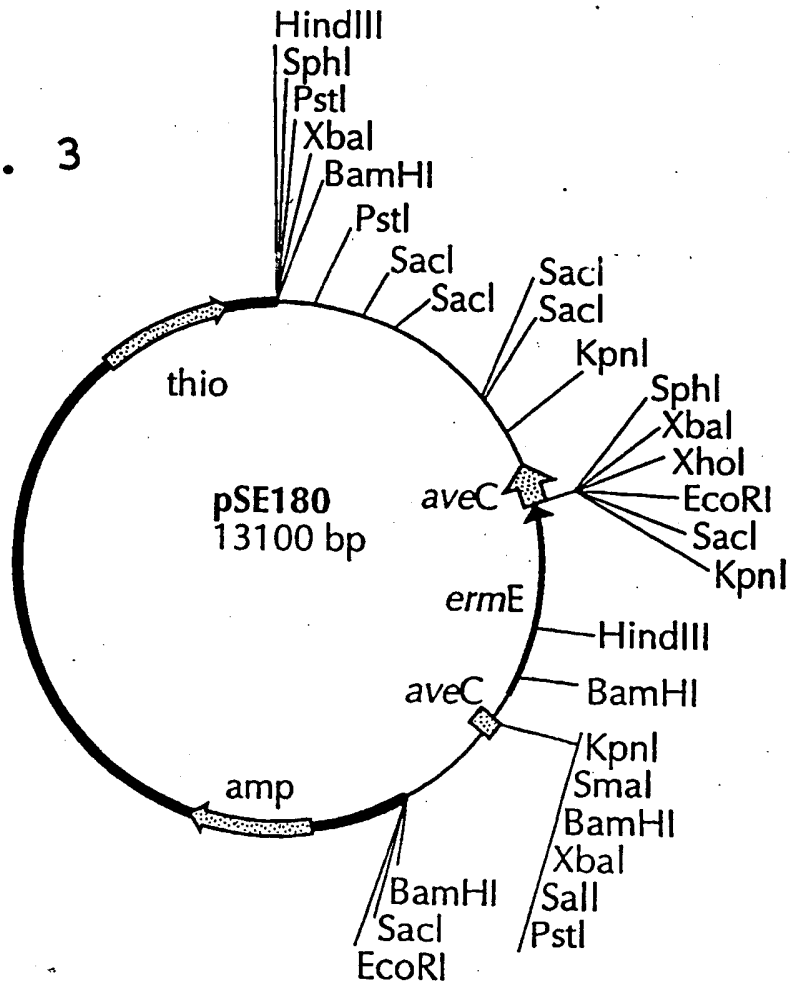
[illegible]

2/7

Obr. 2

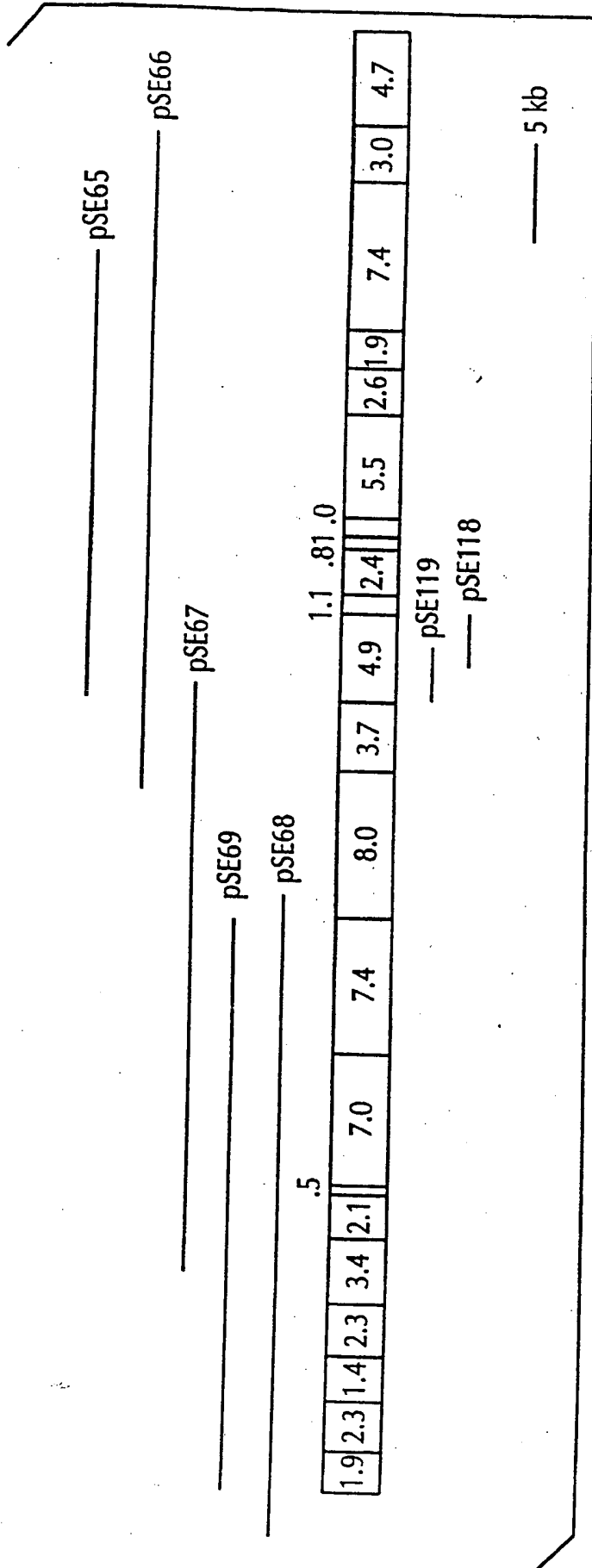


Obr. 3

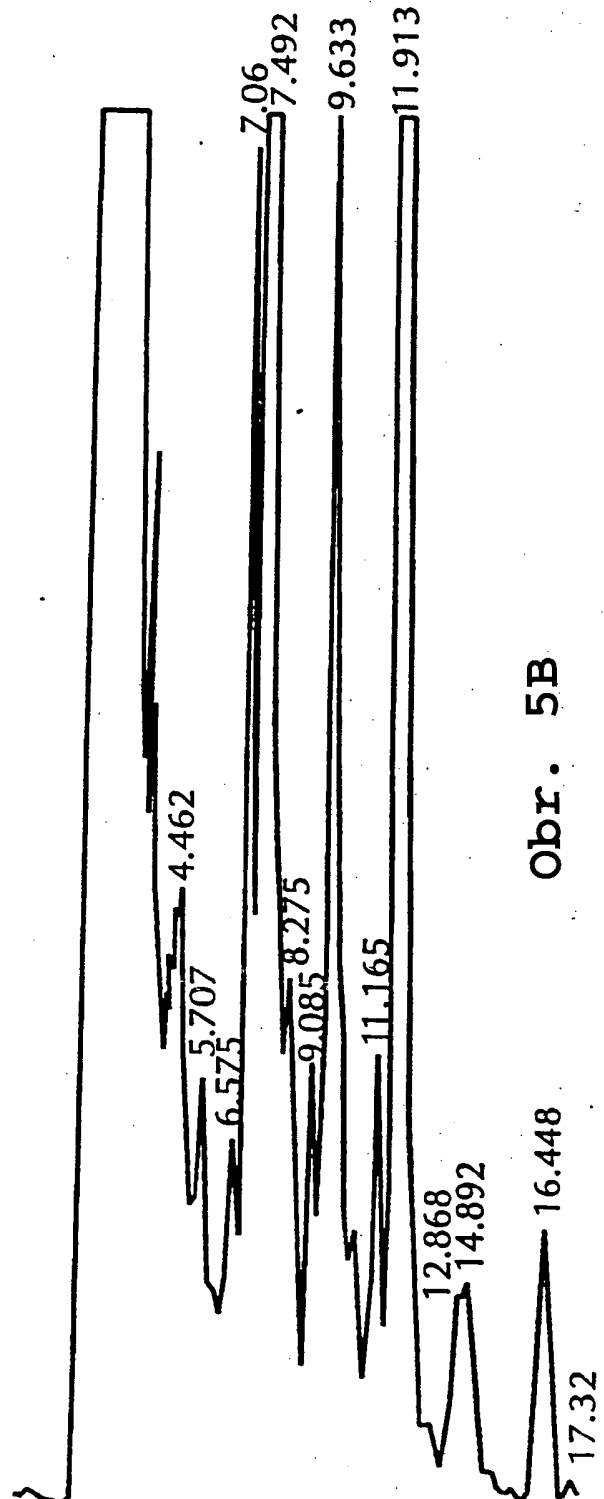
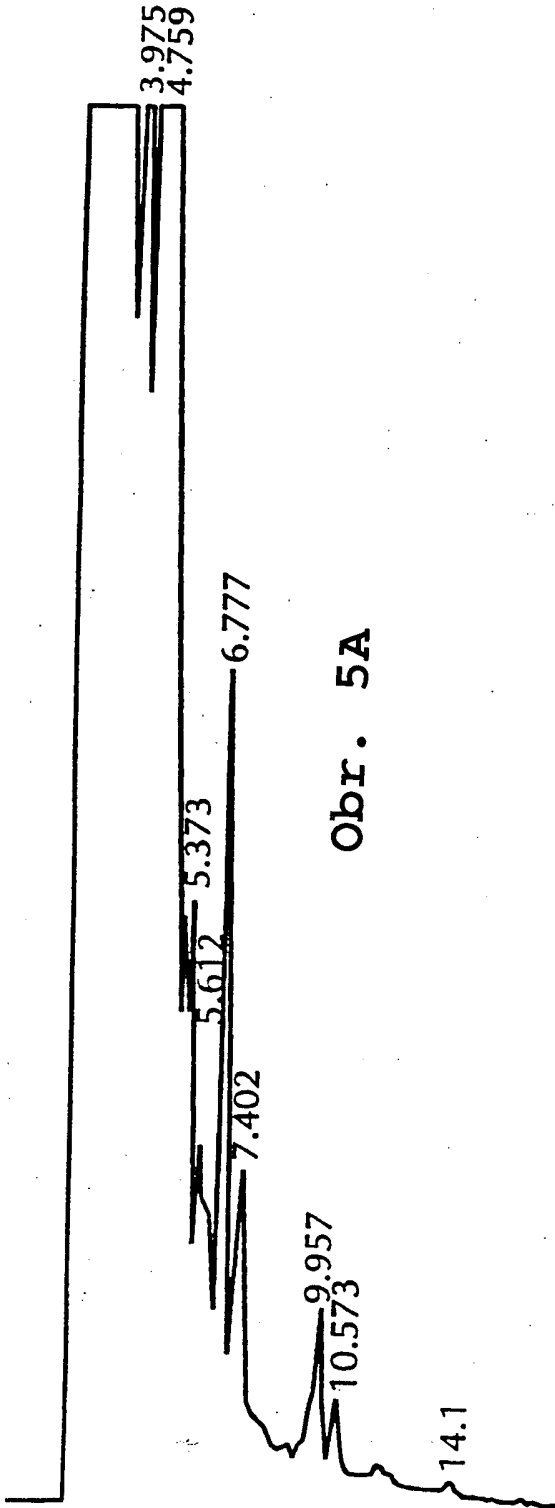


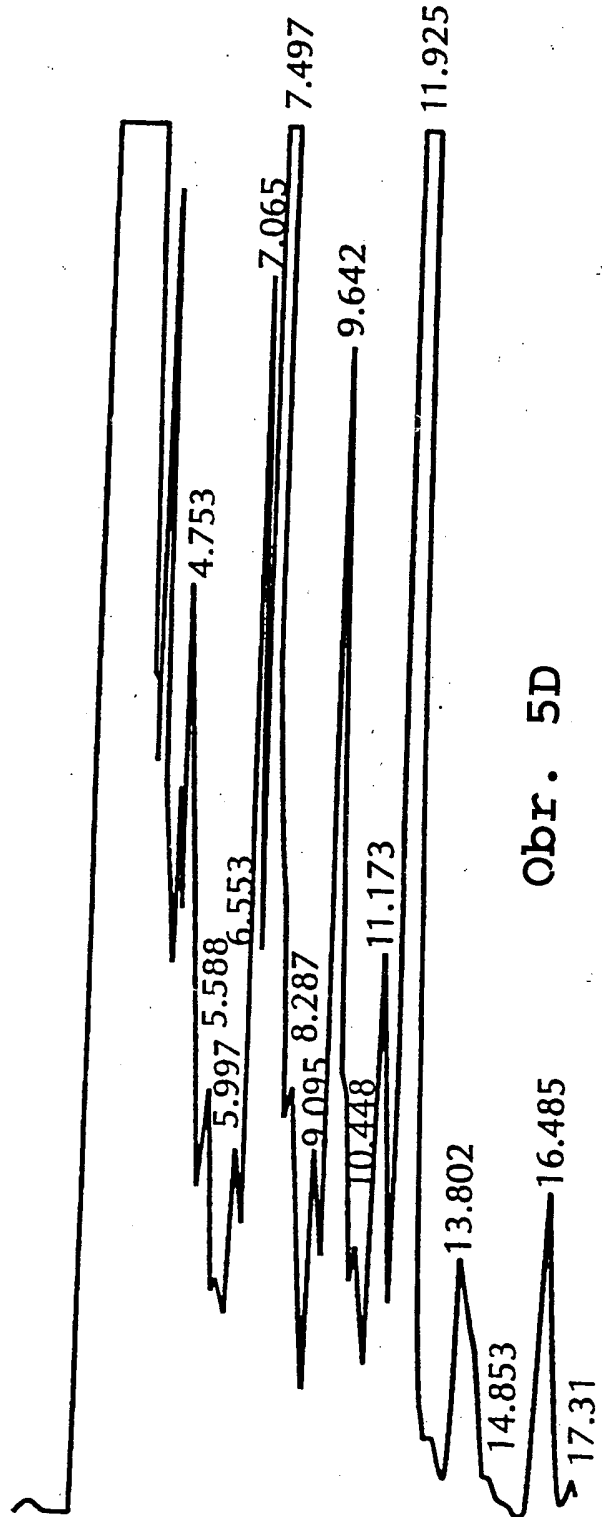
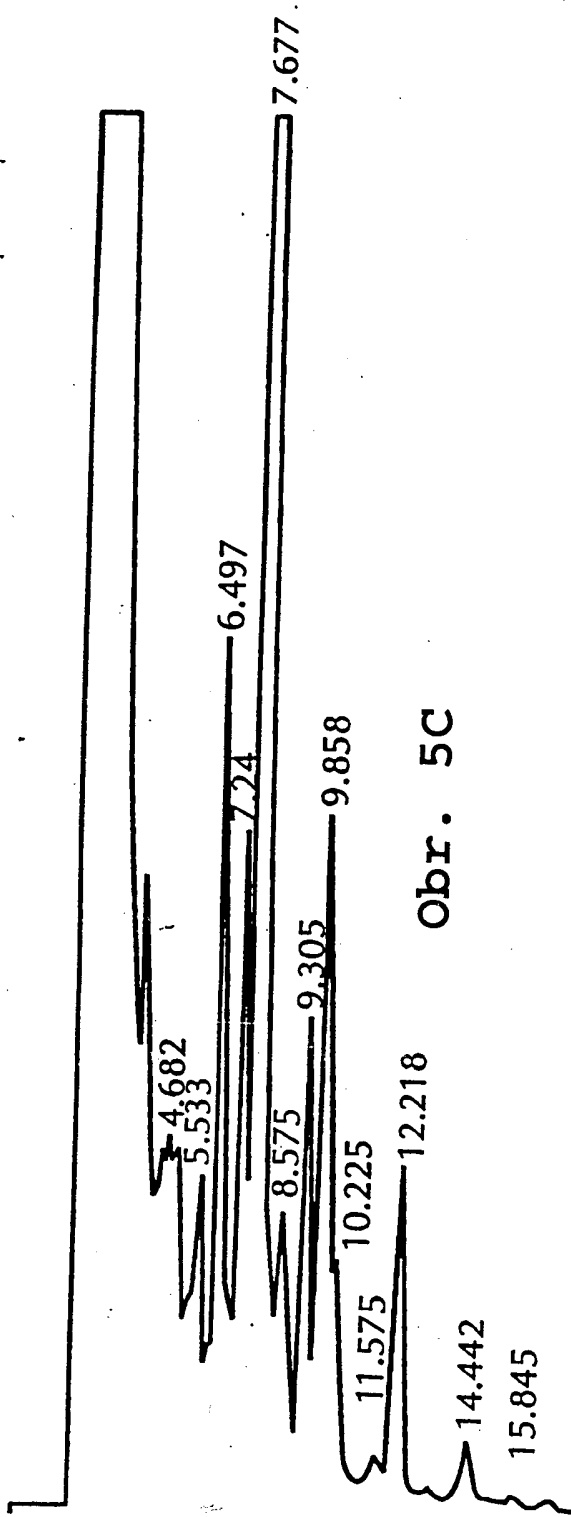
23.05.00

3/7



Obr. 4





23.05.02

6/7

Obr. 6

S. ave
S. gri
S. hyg
Cons

.....
.....
VFTLP

1 50
S. ave VVVWAGVGLL FLALQAYVFS RWAADGGYRL IETAGQGQGG SKDTGTDDVV
S. gri VIGWAALGAV FLVLQVYVFA RWTADGGYHL ADVSGPDGRE PGHRRIIDVL
S. hyg VTLWACVGAL VLGLQVYVFA AWLADSGYR. IEKASPARGG GDSERIADVL
Cons V--WA-vGal fL-LQvYVFa rW-ADgGYrl ie-agp--gg ----r--DVL

51 100
S. ave YPVISVVCIT AAAAWLFRRC RVERRLLFDA LLFLGLLFAS WQSPLMNWFH
S. gri LPALSMAGVV GLAFWLVRWV RAERRLSFDA LLFTGVLFAG WLSPLMNWFH
S. hyg IPLLSVVGAV VLAVCLYRRC RARRRLTFDA SLFIGLLSAS WQSPLMNWLN
Cons -P-lSvvg-v -lA-wL-RRc RaERRL-FDA llF-GlLfAs WqSPLMNWfh

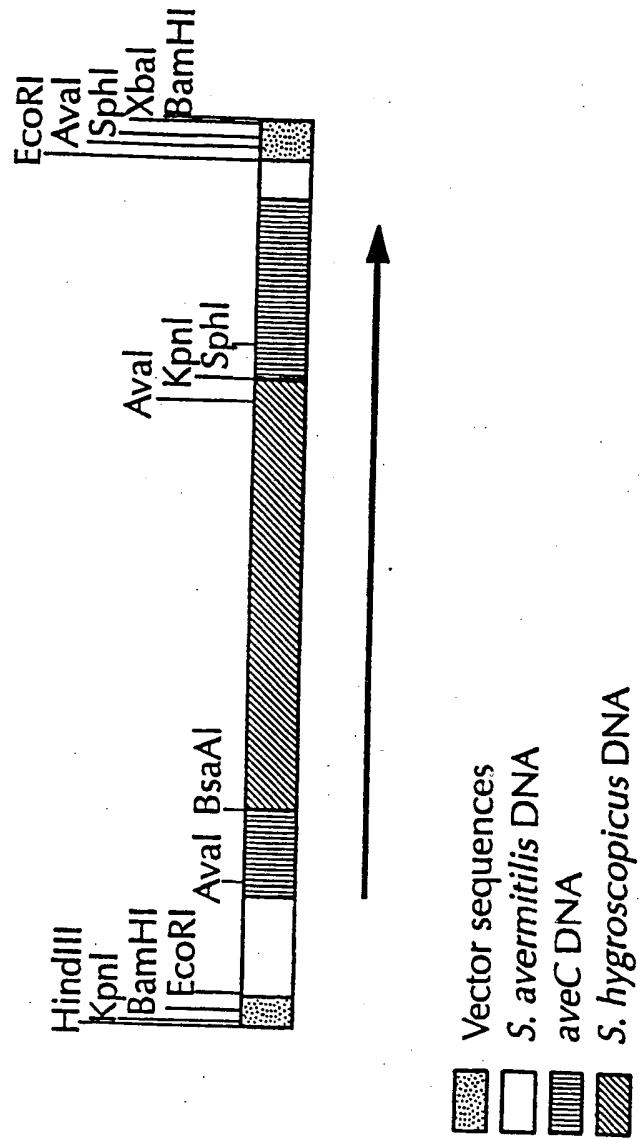
101 150
S. ave SVLVSNASVW GAVGSWGPYV PGWQGAGPGA EAEMPLASAS VCMSALIVTV
S. gri PVLMANTHVW GAVGSWGPYV PGWRGLPPGK EAELPLVTFS LGSTVLLGVL
S. hyg PVLASNvNVF GAVASWGPYV PGWQGAGAHQ EAELPLATLS ICMTAMMAAV
Cons pVL-sN--Vw GAVgSWGPYV PGWqGagpg- EAELPLat-S -cmtal---v

151 200
S. ave LCSKALGWIK ARRPawRTWR LVLAFFFIGI VLGLSEPLPS ASGISVWARA
S. gri GCCQVMSRVR ERWPGVRPWQ LVGLAFLTAV AFDLSEPFIS FAGVSVWARA
S. hyg ACGKGMGLAA ARWPRLGPLR LIALGFLLVV LLDIAEPLVS FAGVSVWTRA
Cons -C-k-mg--- aRwP--rpwr Lv-l-Fl--v -ldlsePl-S faGvSVWaRA

201 250
S. ave LPEVTLWSGE WYQFPVYQAV GSGLVCCMLG SLRFFRDERD ESWVERGAWR
S. gri LPTVTLWRGA WYRAR-----
S. hyg VPELTIWSGH WYQFPYQMV ASALFGASLG AARHFRNRRG ETCLESGAAL
Cons lPevTlWsG- WYqfp-yq-v -s-l----lg --r-fr--r- e---e-ga--

251 300
S. ave LPQRAANWAR FLAVVGGVNA VMFLYT...C FHILLSLVGG QPPDQLPDSF
S. gri -----
S. hyg LPEGPRPWVR LLAVVGGANI SIALYTGAGH AHILFSLMDG APPDRLPEFF
Cons lp-----w-r -lavvvgg-n- ---lyt---- -hil-sl--g -ppd-lp--f

301
S. ave QAPAAAY*
S. gri -----
S. hyg RPAAGY*
Cons ---a-y



Obj. 7

23.05.02

PV2002-297

38842

Sekvence

<110> PFIZER PRODUCTS INC.

<120>

Gen Streptomyces avermitilis řídící poměr B2:B1 avermektinů

<130> PC10649A

<140> PC10649

<141> 1999-08-12

<150> 60/074,636

<151> 1998-02-13

<150> PCT/IB99/00130

<151> 1999-01-25

<160> 25

<170> PatentIn Ver. 2.1

<210> 1

<211> 1229

<212> DNA

<213> Streptomyces avermitilis

<220>

<221> CDS

<222> (174)..(1085)

<400> 1

tcacgaaacc ggacacacca cacacacgaa ggtgagacag cgtgaaccca tccgagccgc 60

tcggcctgcc caacgaacgt gtagtagaca cccgaccgtc cgatgccacg ctctcacccg 120

aggccggcct gaacaggtca ggagcgctgc cccgtgaact gctgtcgttg ccg gtg 176
Val

1

gtg gtg tgg gcc ggg gtc ggc ctg ctg ttt ctg gcc ctg cag gcg tac 224

Val Val Trp Ala Gly Val Gly Leu Leu Phe Leu Ala Leu Gln Ala Tyr

5

10

15

gtg ttc agc cgc tgg gcg gcc gac ggt ggc tac cgg ctg atc gag acg 272

Val Phe Ser Arg Trp Ala Ala Asp Gly Gly Tyr Arg Leu Ile Glu Thr

20

25

30

23.05.02

gcg ggc cag ggt cag ggc ggc agc aag gat acg ggg act acc gat gtg	320
Ala Gly Gln Gly Gln Gly Gly Ser Lys Asp Thr Gly Thr Thr Asp Val	
35 40 45	
gtc tat ccc gtg att tcc gtc gtc tgc atc acc gcc gcg gcg gcg tgg	368
Val Tyr Pro Val Ile Ser Val Val Cys Ile Thr Ala Ala Ala Ala Trp	
50 55 60 65	
ctc ttc cgg agg tgc cgt gtc gaa cga cgg ctg ctg ttc gac gcc ctt	416
Leu Phe Arg Arg Cys Arg Val Glu Arg Arg Leu Leu Phe Asp Ala Leu	
70 75 80	
ctc ttc ctc ggg ctg ctg ttc gcg agc tgg cag agc ccg ctc atg aac	464
Leu Phe Leu Gly Leu Leu Phe Ala Ser Trp Gln Ser Pro Leu Met Asn	
85 90 95	
tgg ttc cat tcc gtt ctc gtc tcc aac gcg agt gtg tgg ggc gcg gtg	512
Trp Phe His Ser Val Leu Val Ser Asn Ala Ser Val Trp Gly Ala Val	
100 105 110	
ggt tcc tgg ggt ccg tat gtg ccc ggc tgg cag ggg gcg gcc ccg ggt	560
Gly Ser Trp Gly Pro Tyr Val Pro Gly Trp Gln Gly Ala Gly Pro Gly	
115 120 125	
gcg gag gcg gaa atg ccg ctg gcg tcg gcc tcc gtc tgc atg tcg gct	608
Ala Glu Ala Glu Met Pro Leu Ala Ser Ala Ser Val Cys Met Ser Ala	
130 135 140 145	
ctg atc gtc acc gtg ctg tgc agc aag gca ctg ggg tgg atc aag gcc	656
Leu Ile Val Thr Val Leu Cys Ser Lys Ala Leu Gly Trp Ile Lys Ala	
150 155 160	
cgc cgg ccg gca tgg cgg acc tgg cgg ctg gtc ctg gcc gtg ttc ttc	704
Arg Arg Pro Ala Trp Arg Thr Trp Arg Leu Val Leu Ala Val Phe Phe	
165 170 175	
atc ggc atc gtg ctc ggt ctg tcc gag ccg ctg ccg tcc gcc tcc ggg	752
Ile Gly Ile Val Leu Gly Leu Ser Glu Pro Leu Pro Ser Ala Ser Gly	
180 185 190	
atc agc gta tgg gcc aga gcg ctg ccc gag gtg acc ttg tgg agt ggc	800
Ile Ser Val Trp Ala Arg Ala Leu Pro Glu Val Thr Leu Trp Ser Gly	
195 200 205	
gag tgg tac cag ttc ccc gtg tat cag gcg gtc ggt tcc gcc ctg gtc	848
Glu Trp Tyr Gln Phe Pro Val Tyr Gln Ala Val Gly Ser Gly Leu Val	
210 215 220 225	

23.05.02

tgc tgc atg ctg ggc tcg ctg cgc ttc ttc cgc gac gaa cgc gat gag 896
Cys Cys Met Leu Gly Ser Leu Arg Phe Phe Arg Asp Glu Arg Asp Glu
230 235 240

tcg tgg gtg gaa cgg gga gcc tgg cgg ttg ccg caa cgg gca gcg aac 944
Ser Trp Val Glu Arg Gly Ala Trp Arg Leu Pro Gln Arg Ala Ala Asn
245 250 255

tgg gcg cgt ttc ctc gcc gtg gtc ggt ggg gtg aat gcc gtg atg ttc 992
Trp Ala Arg Phe Leu Ala Val Val Gly Gly Val Asn Ala Val Met Phe
260 265 270

ctc tac acc tgt ttc cat atc ctc ctg tcc ctc gtc ggt gga cag ccg 1040
Leu Tyr Thr Cys Phe His Ile Leu Leu Ser Leu Val Gly Gly Gln Pro
275 280 285

ccc gac caa ctg ccg gac tcc ttc caa gcg ccg gcc gct tac tga 1085
Pro Asp Gln Leu Pro Asp Ser Phe Gln Ala Pro Ala Ala Tyr
290 295 300

gttcagggca ggtcggagga gacggagaag gggaggcgac cggagttccg gtcacctccc 1145

ctttgtgcat ggggtggacgg ggatcacgct cccatggcgg cgggctctc cagacgcacc 1205

acactcctcg gttcagcgat catg 1229

<210> 2

<211> 303

<212> PRT

<213> Streptomyces avermitilis

<400> 2

Val Val Val Trp Ala Gly Val Gly Leu Leu Phe Leu Ala Leu Gln Ala
1 5 10 15
Tyr Val Phe Ser Arg Trp Ala Ala Asp Gly Gly Tyr Arg Leu Ile Glu
20 25 30
Thr Ala Gly Gln Gly Gln Gly Gly Ser Lys Asp Thr Gly Thr Thr Asp
35 40 45
Val Val Tyr Pro Val Ile Ser Val Val Cys Ile Thr Ala Ala Ala Ala
50 55 60
Trp Leu Phe Arg Arg Cys Arg Val Glu Arg Arg Leu Leu Phe Asp Ala
65 70 75 80
Leu Leu Phe Leu Gly Leu Leu Phe Ala Ser Trp Gln Ser Pro Leu Met
85 90 95
Asn Trp Phe His Ser Val Leu Val Ser Asn Ala Ser Val Trp Gly Ala
100 105 110
Val Gly Ser Trp Gly Pro Tyr Val Pro Gly Trp Gln Gly Ala Gly Pro

23.05.02

115	120	125
Gly Ala Glu Ala Glu Met Pro Leu Ala Ser Ala Ser Val Cys Met Ser		
130	135	140
Ala Leu Ile Val Thr Val Leu Cys Ser Lys Ala Leu Gly Trp Ile Lys		
145	150	155
Ala Arg Arg Pro Ala Trp Arg Thr Trp Arg Leu Val Leu Ala Val Phe		
165	170	175
Phe Ile Gly Ile Val Leu Gly Leu Ser Glu Pro Leu Pro Ser Ala Ser		
180	185	190
Gly Ile Ser Val Trp Ala Arg Ala Leu Pro Glu Val Thr Leu Trp Ser		
195	200	205
Gly Glu Trp Tyr Gln Phe Pro Val Tyr Gln Ala Val Gly Ser Gly Leu		
210	215	220
Val Cys Cys Met Leu Gly Ser Leu Arg Phe Phe Arg Asp Glu Arg Asp		
225	230	235
Glu Ser Trp Val Glu Arg Gly Ala Trp Arg Leu Pro Gln Arg Ala Ala		
245	250	255
Asn Trp Ala Arg Phe Leu Ala Val Val Gly Gly Val Asn Ala Val Met		
260	265	270
Phe Leu Tyr Thr Cys Phe His Ile Leu Leu Ser Leu Val Gly Gly Gln		
275	280	285
Pro Pro Asp Gln Leu Pro Asp Ser Phe Gln Ala Pro Ala Ala Tyr		
290	295	300

<210> 3
 <211> 1150
 <212> DNA
 <213> Streptomyces hygroscopicus

<220>
 <221> CDS
 <222> (58)..(990)

<400> 3
 gtcgacgaag accggccgga ggccgtcggc cgggccgata ccgtacgcgg cctgcgg 57
 gtg ttc acc ctt ccc gta aca ctg tgg gcg tgt gtc ggc gcg ctg gtg 105
 Val Phe Thr Leu Pro Val Thr Leu Trp Ala Cys Val Gly Ala Leu Val
 1 5 10 15
 ctg gga ctt cag gtg tac gtg ttc gcc gcc tgg ctc gcc gac agc ggc 153
 Leu Gly Leu Gln Val Tyr Val Phe Ala Ala Trp Leu Ala Asp Ser Gly
 20 25 30
 tac cgc atc gag aag gcg tcc ccg gcc agg ggc ggt ggg gac tcg gag 201
 Tyr Arg Ile Glu Lys Ala Ser Pro Ala Arg Gly Gly Gly Asp Ser Glu

23.05.02

35

40

45

cgg atc gcc gat gtg ctg atc ccg ctg ctg tcc gtg gtg gga gcg gtg 249
Arg Ile Ala Asp Val Leu Ile Pro Leu Leu Ser Val Val Gly Ala Val
50 55 60

gtc ctc gca gtg tgt ctg tac cgg agg tgt cgg gcc agg agg cgg ctg 297
Val Leu Ala Val Cys Leu Tyr Arg Arg Cys Arg Ala Arg Arg Arg Leu
65 70 75 80

acg ttc gac gcg tcg ctc ttc atc ggg ctg ctg tcg gcc agt tgg cag 345
Thr Phe Asp Ala Ser Leu Phe Ile Gly Leu Leu Ser Ala Ser Trp Gln
85 90 95

agt ccc ttg atg aac tgg atc aat ccg gtg ctc gcg tca aac gtc aat 393
Ser Pro Leu Met Asn Trp Ile Asn Pro Val Leu Ala Ser Asn Val Asn
100 105 110

gtg ttc gga gcg gtg gcc tcg tgg ggg ccg tat gtg ccc ggt tgg cag 441
Val Phe Gly Ala Val Ala Ser Trp Gly Pro Tyr Val Pro Gly Trp Gln
115 120 125

ggg gcg ggg gcg cac cag gag gcc gag ctg ccg ctg gcg acc ctg agc 489
Gly Ala Gly Ala His Gln Glu Ala Glu Leu Pro Leu Ala Thr Leu Ser
130 135 140

atc tgt atg acg gcc atg atg gcc gcc gtg gcc tgc ggc aag ggc atg 537
Ile Cys Met Thr Ala Met Met Ala Ala Val Ala Cys Gly Lys Gly Met
145 150 155 160

ggt ctt gcc gcc gcc cgg tgg ccg cgg ctg ggg ccg ctc cgg ctg atc 585
Gly Leu Ala Ala Ala Arg Trp Pro Arg Leu Gly Pro Leu Arg Leu Ile
165 170 175

gcg ctc ggc ttt ctg ctc gtc gtg ctc ctc gac atc gcc gag ccg ctg 633
Ala Leu Gly Phe Leu Leu Val Val Leu Leu Asp Ile Ala Glu Pro Leu
180 185 190

gtg tcc ttc gcg ggc gtc tcc gtg tgg acg cgg gca gtg ccc gag ctg 681
Val Ser Phe Ala Gly Val Ser Val Trp Thr Arg Ala Val Pro Glu Leu
195 200 205

acc atc tgg agt ggg cac tgg tat cag ttc ccg ctg tat cag atg gtg 729
Thr Ile Trp Ser Gly His Trp Tyr Gln Phe Pro Leu Tyr Gln Met Val
210 215 220

gct tcg gcg ctc ttc ggc gcc tct ttg ggg gcc gcg cgc cac ttt cgc 777
Ala Ser Ala Leu Phe Gly Ala Ser Leu Gly Ala Ala Arg His Phe Arg

23.05.02

225	230	235	240	
aac cgg cgc ggc gaa acg tgt ctg gag tcc ggg gcg gcc ctc cta ccg				825
Asn Arg Arg Gly Glu Thr Cys Leu Glu Ser Gly Ala Ala Leu Leu Pro				
245		250	255	
gag ggc ccg agg cca tgg gtc cgg ctg ctg gcg gtg gtg ggc ggg gcc				873
Glu Gly Pro Arg Pro Trp Val Arg Leu Leu Ala Val Val Gly Gly Ala				
260		265	270	
aac atc agc atc gcc ctc tac acc ggc gca cac ggc gca cac atc ctg				921
Asn Ile Ser Ile Ala Leu Tyr Thr Gly Ala His Gly Ala His Ile Leu				
275		280	285	
ttc tcg ctg atg gac ggc gct ccc ccg gac cgg ctc ccc gaa ttc ttc				969
Phe Ser Leu Met Asp Gly Ala Pro Pro Asp Arg Leu Pro Glu Phe Phe				
290		295	300	
cgt ccg gcg gcc ggc tac tga gaccgccggc accacccacg taccgatgt				1020
Arg Pro Ala Ala Gly Tyr				
305		310		
gcgcgatgtg cctgatgcgc ctgatgtacc cggggtgtca tcggctcacc tgtggcgcc				1080
catgcggtga gcgctccgcc tcgtccttgt tccggctcct gggctccacg accatacgga				1140
gcggccgggg				1150

<210> 4
 <211> 310
 <212> PRT
 <213> Streptomyces hygroscopicus

<400> 4
 Val Phe Thr Leu Pro Val Thr Leu Trp Ala Cys Val Gly Ala Leu Val
 1 5 10 15
 Leu Gly Leu Gln Val Tyr Val Phe Ala Ala Trp Leu Ala Asp Ser Gly
 20 25 30
 Tyr Arg Ile Glu Lys Ala Ser Pro Ala Arg Gly Gly Gly Asp Ser Glu
 35 40 45
 Arg Ile Ala Asp Val Leu Ile Pro Leu Leu Ser Val Val Gly Ala Val
 50 55 60
 Val Leu Ala Val Cys Leu Tyr Arg Arg Cys Arg Ala Arg Arg Arg Leu
 65 70 75 80
 Thr Phe Asp Ala Ser Leu Phe Ile Gly Leu Leu Ser Ala Ser Trp Gln
 85 90 95
 Ser Pro Leu Met Asn Trp Ile Asn Pro Val Leu Ala Ser Asn Val Asn

[illegible]

<210> 5

<211> 215

<212> PRT

<213> Streptomyces griseochromogenes

<400> 5

Val Ile Gly Trp Ala Ala Leu Gly Ala Val Phe Leu Val Leu Gln Val
1 5 10 15

Tyr Val Phe Ala Arg Trp Thr Ala Asp Gly Gly Tyr His Leu Ala Asp
20 25 30

Val Ser Gly Pro Asp Gly Arg Glu Pro Gly His Arg Arg Ile Ile Asp
35 40 45

Val Leu Leu Pro Ala Leu Ser Met Ala Gly Val Val Gly Leu Ala Phe
50 55 60

23.05.02

Trp Leu Val Arg Arg Trp Arg Ala Glu Arg Arg Leu Ser Phe Asp Ala
65 70 75 80

Leu Leu Phe Thr Gly Val Leu Phe Ala Gly Trp Leu Ser Pro Leu Met
85 90 95

Asn Trp Phe His Pro Val Leu Met Ala Asn Thr His Val Trp Gly Ala
100 105 110

Val Gly Ser Trp Gly Pro Tyr Val Pro Gly Trp Arg Gly Leu Pro Pro
115 120 125

Gly Lys Glu Ala Glu Leu Pro Leu Val Thr Phe Ser Leu Gly Ser Thr
130 135 140

Val Leu Leu Gly Val Leu Gly Cys Cys Gln Val Met Ser Arg Val Arg
145 150 155 160

Glu Arg Trp Pro Gly Val Arg Pro Trp Gln Leu Val Gly Leu Ala Phe
165 170 175

Leu Thr Ala Val Ala Phe Asp Leu Ser Glu Pro Phe Ile Ser Phe Ala
180 185 190

Gly Val Ser Val Trp Ala Arg Ala Leu Pro Thr Val Thr Leu Trp Arg
195 200 205

Gly Ala Trp Tyr Arg Ala Arg
210 215

<210> 6
<211> 18
<212> DNA
<213> Streptomyces avermitilis

<400> 6
tcacgaaacc ggacacac

18

<210> 7
<211> 18
<212> DNA
<213> Streptomyces avermitilis

<400> 7
catgatcgct gaaccgag

18

23.05.02

<210> 8
<211> 20
<212> DNA
<213> Streptomyces avermitilis

<400> 8
ggttccggat gccgttctcg

20

<210> 9
<211> 21
<212> DNA
<213> Streptomyces avermitilis

<400> 9
aactccggtc gactccccctt c

21

<210> 10
<211> 19
<212> DNA
<213> Streptomyces avermitilis

<400> 10
gcaaggatac ggggactac

19

<210> 11
<211> 18
<212> DNA
<213> Streptomyces avermitilis

<400> 11
gaaccgaccg cctgatac

18

<210> 12
<211> 43
<212> DNA
<213> Streptomyces avermitilis

<400> 12
ggggggcgggc ccgggtgcgg aggcggaaat gccctggcg acg

43

<210> 13
<211> 20

23.05.02

<212> DNA

<213> Streptomyces avermitilis

<400> 13

ggaaccgacc gcctgataca

20

<210> 14

<211> 46

<212> DNA

<213> Streptomyces avermitilis

<400> 14

gggggcgggc ccgggtgcgg aggcggaaat gccgctggcg acgacc

46

<210> 15

<211> 20

<212> DNA

<213> Streptomyces avermitilis

<400> 15

ggaacatcac ggcattcacc

20

<210> 16

<211> 18

<212> DNA

<213> Streptomyces avermitilis

<400> 16

aacccatccg agccgctc

18

<210> 17

<211> 17

<212> DNA

<213> Streptomyces avermitilis

<400> 17

tcggcctgcc aacgaac

17

<210> 18

<211> 18

<212> DNA

<213> Streptomyces avermitilis

23.05.00

<400> 18
ccaacgaacg tgtagtag

18

<210> 19
<211> 20
<212> DNA
<213> Streptomyces avermitilis

<400> 19
tgcaggcgta cgtgttcagc

20

<210> 20
<211> 17
<212> DNA
<213> Streptomyces avermitilis

<400> 20
catgatcgct gaaccga

17

<210> 21
<211> 20
<212> DNA
<213> Streptomyces avermitilis

<400> 21
catgatcgct gaaccgagga

20

<210> 22
<211> 20
<212> DNA
<213> Streptomyces avermitilis

<400> 22
aggagtgtgg tgcgtctgga

20

<210> 23
<211> 19
<212> DNA
<213> Streptomyces avermitilis

<400> 23
cttcagggtgt acgtgttcg

19

23.05.02

<210> 24
<211> 18
<212> DNA
<213> *Streptomyces avermitilis*

<400> 24
gaactggtac cagtgcc

18

<210> 25
<211> 46
<212> DNA
<213> *Streptomyces avermitilis*

<400> 25
gggggcgggc ccgggtgcgg aggcggaaat gccgctggcg acgttc

46