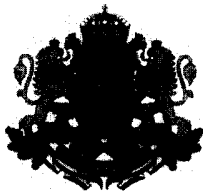


РЕПУБЛИКА БЪЛГАРИЯ



(19) BG

ЗАЯВКА ЗА ПАТЕНТ
ЗА
ИЗОБРЕТЕНИЕ

(11) 106478A

(51) Int.Cl.

C12N 15/60 C12N 9/88 C12N
1/21 C12P 17/18 C12P 19/62

ПАТЕНТНО ВЕДОМСТВО

(21) Заявителски № 106478 (22) Заявено на 05.03.2002 (24) Начало на действие на патента от: Приоритетни данни (31) 372934 (32) 12.08.1999 (33) US (41) Публикувана заявка в бюлетин № 2 27.02.2004 (45) Отпечатано на (46) Публикувано в бюлетин № на (56) Информационни източници: (62) Разделена заявка от рег. №				(71) Заявител(и): PFIZER PRODUCTS INC. , , 06340 GROTON , EASTERN POINT ROAD CONNECTICUT (US) ; (72) Изобретател(и): STUTZMAN-ENGWALL , Kim J . , 06340 Groton CONNECTICUT (US) ; (74) Представител по индустриална собственост: Румяна Стефанова Слабова , 1124 София , ул. "Леонардо да Винчи" 3 (86) № на РСТ заявка: PCT/ IB00/00996 , 19.07.2000 (87) № и дата на РСТ публикация: WO01/12822 , 02.05.2002
---	--	--	--	--

(54) ГЕН НА STREPTOMYCES AVERMITILIS МОДУЛИРАЩ СЪОТНОШЕНИЕТО
НА АВЕРМЕКТИНИТЕ B2:B1

(57) Изобретението се отнася до полинуклеотидни молекули, включващи нуклеотидни последователности, кодиращи продукт на aveC гена. Полинуклеотидните молекули могат да се използват, за да променят съотношението клас 2:1 или количеството на авермектините, получени при ферментация от култури на S. avermitilis. Изобретението се отнася и до вектори, клетки гостоприемници и мутантни щамове на S. avermitilis, в които е инактивиран aveC генът или е мутирал по такъв начин, че променя съотношението клас 2:1 или количеството на получените авермектини. 17 претенции

BG 106478 A

05.03.02

2064/02-PC

ГЕН НА *STREPTOMYCES AVERMITILIS* МОДУЛИРАШ СЪОТНОШЕНИЕТО НА АВЕРМЕКТИНИТЕ В2:В1

1. ОБЛАСТ НА ТЕХНИКАТА

Настоящото изобретение е насочено към състави и методи за продукция на авермектини, и първоначално към областта на здравеопазването при животните. По-специално настоящето изобретение се отнася до полинуклеотидни молекули, включващи нуклеотидни последователности, кодиращи продукта на AveC гена, който може да бъде използван за модулиране на съотношението клас 2:1 на авермектините, получени чрез ферментация от култури на *Streptomyces avermitilis* и до състави и методи за скриниране на такива полинуклеотидни молекули. Настоящото изобретение по-нататък се отнася до вектори, трансформирани клетки-гостоприемници и нови мутантни щамове на *S. avermitilis* с мутации в aveC гена, които да модулират съотношението клас 2:1 на получените авермектини.

2. ПРЕДШЕСТВАЩО НИВО НА ТЕХНИКАТА

2.1. АВЕРМЕКТИНИ

Видовете *Streptomyces* продуцират голямо разнообразие от вторични метаболити, включително и авермектини които включват серия от осем от 16 членното семейство на макроцикличните лактони, които притежават силна противоглистна и инсектицидна активност. Осемте различни, но близко родствени съединения се отнасят като A1a,

A1b, A2a, A2b, B1a, B1b, B2a и B2b. Серията на съединения "а" се отнася до естествени авермектини където заместителя в позиция C25 е (S)-втор.-бутил, а серията "б" се отнася до тези съединения, където заместителя в позиция C25. е изопропил. Означенията "А" и "В" се отнасят до авермектини, където заместителят в позиция C5 е съответно метокси и хидроксид. Номерацията "1" се отнася до авермектини, където двойната връзка присъства в позиция C22,C23 и номерацията "2" се отнася до авермектини които имат водород в позиция C22 и хидроксид в позиция C23. Между тези авермектини, авермектин от тип В1 е известен с това че притежава по-ефективна антипаразитна и пестицидна активност, и поради това е най-предпочитания авермектин с търговско значение.

Авермектините и тяхната продукция, чрез аеробна ферментация от шамове на *S. avermitilis* са описани в United States Патенти 4,310,519 и 4,429,042. Счита се, че биосинтезата на естествени авермектини е инициирана ендогенно от CoA тиоестерни аналози на изомаслената киселина и S-(+)-2-метил маслената киселина.

Комбинацията от подобряването на щама, чрез случайна мутагенеза и използването на екзогенно приложени мастни киселини води до ефективна продукция на авермектинови аналози. Мутанти на *S. avermitilis*, които са дефицитни по отношение на киселата дехидрогеназа за 2-оксо разклонената верига могат да продуцират авермектини само когато при ферментациите се доставят мастни киселини. Скринингът и изолирането на мутанти дефицитни по отношение на дехидрогеназната активност за разклонената верига (напр. *S. avermitilis*, ATCC 53567) са описани в Европейски Патент (EP) 276103. Ферментацията при такива мутанти в присъствието на екзогенно приложени мастни киселини води до продукцията само на четири авермектина, съответстващи на въведените мастни киселини.

05.03.02

Така ферментациите на *S. avermitilis* (ATCC 53567) при прилагане на S-(+)-2-метилмаслена киселина води до продукцията на естествените авермектини A1a, A2a, B1a и B2a, прилагането на изомаслена киселина, при ферментацията води до продукцията на естествените авермектини A1b, A2b, B1b и B2b, и когато при ферментацията се прилага циклопентанкарбоксилна киселина, това води до продукцията на четири нови циклични авермектини A1, A2, B1 и B2.

Ако се приложат други мастни киселните се получават нови авермектини. Чрез скрининг на над 800 потенциални прекурсори са идентифицирани повече от 60 други нови авермектини (Виж напр. Dutton et al., 1991, J. Antibiot. 44:357-365; и Banks et al., 1994, Roy. Soc. Chem. 147:16-26). В допълнение, мутанти на *S. avermitilis* дефицитни по отношение на 5-О-метилтрансферазната активност продуцират най-вече само В аналозите на авермектините. В последствие, *S. avermitilis* мутанти, при които липсват киселата дехидрогеназа на 2-оксо разклонената верига и 5-О-метилтрансферазната активност, продуцират само В авермектините отговарящи на мастните киселини, участващи във ферментацията. Така прилагането на S-(+)-2-метилмаслена киселина при двойни мутанти, води до продукцията само на естествените авермектини B1a и B2a, докато прилагането на изомаслена киселина или циклопентанкарбоксилна киселина води до продукцията на естествените авермектини B1b и B2b или съответно до новите циклопентилови авермектини B1 и B2. Прилагането на циклохексан карбоксилна киселина при двойният мутантен щам е предпочитан метод за продукция на нов авермектин – авермектин циклохексил B1 (дормектин) с важно търговско значение. Изолирането и характеризирането на такива двойни мутанти, напр. *S. avermitilis* (ATCC 53692) е описано в EP 276103.

2.2. ГЕНИ АНГАЖИРАНИ В БИОСИНТЕЗАТА НА АВЕРМЕКТИНИТЕ.

В много случаи, гените ангажирани в продукцията на вторични метаболити и гените, кодиращи специфични антибиотици се намират групирани като клъстери в хромозомата. Такъв е случая например с гените, кодиращи поликетид синтетазата - PKS генния клъстер на *Streptomyces* (виж. Hopwood и Sherman, 1990, Ann.Rev. Genet. 24:37-66). Така, една от стратегиите за клониране на гени, ангажирани в биосинтетичния път е изолирането на гена за резистентност към лекарствени препарати и след това проверка на съседните райони на хромозомата за други гени отнасящи се към биосинтезата на този антибиотик. Друга стратегия за клониране на гени, ангажирани в биосинтезата на важни метаболити е допълването на мутантите. Например, части от ДНК библиотека на организъм, способен да продуцира специфичен метаболит се въвежда в мутант, който не го продуцира и трансформантите се скринират за продукцията на метаболитите. Използва се също хибридизация на библиотеката със сонди, произхождащи от други видове *Streptomyces* за идентифициране и клониране на гени, ангажирани в биосинтетичните пътища.

Гените ангажирани в биосинтеза на авермектин (ave гените), също като гените, ангажирани в биосинтеза на други вторични метаболити на *Streptomyces* (например PKS) се намират групирани като клъстери в хромозомата. Известен брой ave гени са клонирани успешно, чрез използване на вектори за допълване на *S. avermitilis* мутантите, в които е блокирана авермектиновата биосинтеза. Клонирането на такива гени е описано в U.S. Патент 5,252,474. В допълнение, Ikeda et al., 1995, Antibiot. 48:532-534, описва районът на хромозомата, където е локализиран гена aveC, ангажиран в стъпката на

05.03.02

дехидратиране при C22,23, който е фрагмент с размери 4.82 Kb, получен при рязане с Bam HI на ДНК от *S. avermitilis*, и също така мутации в aveC гена, които водят само до продукцията на компонент B2a. Тъй като ивермектинът, който притежава висока противоглистна активност може да бъде получен по химичен път от авермектин B2a, се счита че такъв продуцент който продуцира само авермектиновия компонент B2a, може да се използва специфично за получаването на ивермектин с търговска цел.

Идентифициране на мутации в aveC гена които свеждат до минимум кимплицираността на авермектиновата продукцията, каквито са например мутации, които намаляват съотношението B2:B1 на авермектините, ще опростят продукцията и пречистването на авермектини с търговско значение.

3. ТЕХНИЧЕСКА СЪЩНОСТ НА ИЗОБРЕТЕНИЕТО

Настоящото изобретение осигурява изолирана полинуклеотидна молекула, която включва пълната ORF на aveC гена на *S. avermitilis* или съществена част от нея, в която изолирана полинуклеотидна молекула липсва следващата пълна ORF, за която *in situ* е доказано, че се намира в хромозомата на *S. avermitilis* преди ORF на aveC гена. Изолираната полинуклеотидна молекула от настоящето изобретение за предпочитане включва нуклеотидна последователност, която е същата като тази на плазмид pSE186 (ATCC 209604), кодираща продукта на AveC гена на *S. avermitilis* или същата като нуклеотидната последователност на ORF на aveC показана на Фиг.1 (SEQ ID NO:1), или съществена част от нея. Настоящото изобретение по-нататък осигурява изолирана полинуклеотидна молекула, която включва нуклеотидна последователност SEQ ID NO:1 или изроден неин вариант.

05.03.02

Настоящото изобретение по-нататък осигурява изолирана полинуклеотидна молекула, която има нуклеотидна последователност, която е хомоложна на тази на плазмид pSE186 (ATCC 209604), кодираща продукта на AveC гена на *S. avermitilis*, или на нуклеотидната последователност на ORF на aveC представена на ФИГУРА 1 (SEQ ID NO:1), или на съществена част от нея.

Настоящото изобретение по-нататък осигурява изолирана полинуклеотидна молекула, включваща нуклеотидната последователност, кодираща полипептид, който има аминокиселинна последователност, която е хомоложна на аминокиселинната последователност, кодирана от последователността на плазмид pSE186 (ATCC 209604), кодираща продукта на AveC гена, или аминокиселинна последователност на SEQ ID NO:2, показана на ФИГУРА 1, или съществена част от нея.

Настоящото изобретение по-нататък осигурява изолирана полинуклеотидна молекула, включваща последователност, кодираща продукта на хомолога на AveC гена. В предпочитан вариант, изолираната полинуклеотидна молекула включва нуклеотидна последователност от *S. hygroscopicus*, кодираща продукта на хомолога на AveC гена, като продукта на хомолога на гена включва аминокиселинна последователност SEQ ID NO:4, или съществена част от нея. В предпочитан вариант, изолираната полинуклеотидна молекула от *S. hygroscopicus* от настоящето изобретение, която кодира продукта на хомолога на AveC гена, включва нуклеотидната последователност SEQ ID NO:3, или съществена част от нея.

Настоящото изобретение по-нататък осигурява изолирана полинуклеотидна молекула, която включва нуклеотидна последователност, която е хомоложна на нуклеотидната последователност SEQ ID NO:3 на *S. hygroscopicus*. Настоящото

05.03.02

изобретение по-нататък осигурява изолирана полинуклеотидна молекула, включваща нуклеотидна последователност, която е хомоложна на гена на *S. hygroscopicus*, който е хомолог на гена кодиращ AveC генния продукт, кодираща полипептид който има аминокиселинна последователност SEQ ID NO:4.

Настоящото изобретение по-нататък осигурява олигонуклеотиди, които хибридизират с полинуклеотидна молекула, която има нуклеотидната последователност от ФИГУРА 1 (SEQ ID NO:1) или SEQ ID NO:3, или с полинуклеотидна молекула, която има нуклеотидна последователност, която е комплементарна на нуклеотидната последователност от ФИГУРА 1 (SEQ ID NO:1) или на SEQ ID NO:3.

Настоящото изобретение по-нататък осигурява рекомбинантни вектори за клониране или експресия, които се използват за клониране и експресия на полинуклеотид от настоящето изобретение, включващ полинуклеотидни молекули, включващи ORF на aveC на *S. avermitilis* или на хомолога на ORF на aveC. В неограничен вариант, настоящето изобретение осигурява плазмид pSE186 (ATCC 209604), който включва пълната ORF на aveC гена на *S. avermitilis*. Настоящото изобретение по-нататък осигурява трансформирани клетки-гостоприемници, които включват полинуклеотидна молекула или рекомбинантен вектор от изобретението и нови щамове или клетъчни линии, произхождащи от тях.

Настоящото изобретение по-нататък осигурява рекомбинантно експресиран продукт на AveC гена или на продукта на хомолога на AveC гена, или на съществена част от него, който е значително пречистен или изолиран, както и неговите хомолози. Настоящото изобретение по-нататък осигурява метод за получаване на рекомбинантен продукт на AveC гена, включващ култивиране на

05.03.02

клетки-гостоприемници, трансформирани с рекомбинантния вектор за експресия, наречен рекоминантен експресионен вектор, включващ полинуклеотидна молекула, която има нуклеотидна последователност кодираща продукт на AveC гена, или продукта на хомолога на AveC гена, която полинуклеотидна молекула е в оперативна асоциация с един или повече регулаторни елементи, които контролират експресията на полинуклеотидната молекула в клетките-гостоприемници, при условия водещи до получаване на рекомбинантния продукт на AveC гена или на продукт на хомолога на AveC гена и до повторното получаване на продукта на AveC гена или на продукта на хомолога на AveC гена от клетъчната култура.

Настоящото изобретение по-нататък осигурява полинуклеотидна молекула, включваща нуклеотидна последователност, която в други случаи е същата като тази на AveC алела на *S. avermitilis* или като нуклеотидната последователност на плазмид pSE186 (ATCC 209604), кодираща продукта на AveC гена, или на изроден негов вариант, или като нуклеотидната последователност на ORF на aveC на *S. avermitilis* щам, представена на ФИГУРА 1 (SEQ ID NO:1) или изроден неин вариант, но която по-нататък включва една или повече мутации, така че клетките на *S. avermitilis* щам ATCC 53692 в който дивия тип aveC алел е инактивиран и който експресира полинуклеотидната молекула, включваща мутиралата нуклеотидна последователност продуцират различно съотношение или количество на авермектини, в сравнение с тези получени от клетки на *S. avermitilis* щам ATCC 53692, който вместо това експресира само дивия тип aveC алел. Що се отнася до настоящето изобретение, такива полинуклеотидни молекули могат да бъдат използвани за създаването на нови щамове на *S. avermitilis*, които показват видима промяна в продукцията на авермектини, в сравнение със същия щам, който вместо

05.03.02

това експресира само дивия тип aveC алел. В предпочитан вариант, такива полинуклеотидни молекули се използват за създаване на нови щамове на *S. avermitilis*, с редуцирано съотношение клас 2:1 на получените авермектини, в сравнение с тези получени от същия щам, който вместо това експресира само дивия тип aveC алел. По-нататък в предпочитан вариант, такива полинуклеотидни молекули се използват за създаването на нови щамове на *S. avermitilis*, които продуцират повишени нива от авермектини, в сравнение със същия щам, който вместо това експресира само единичен див тип aveC алел. По-нататък в предпочитан вариант такива полинуклеотидни молекули се използват за създаването на нови щамове, в които aveC генът е инактивиран.

Настоящото изобретение осигурява методи за идентифициране на мутации в ORF на aveC на *S. avermitilis*, способни да променят съотношението и/или количеството на получените авермектини. В предпочитан вариант, настоящето изобретение осигурява метод за идентифициране на мутации в ORF на aveC, способни да променят съотношението клас 2:1 на продукцираните авермектини, който включва: (а) определяне на съотношението клас 2:1 на авермектините, получени от клетки на щам *S. avermitilis*, в който е инактивиран нативният aveC алел и в който полинуклеотидна молекула, включваща нуклеотидна последователност, кодираща продукт на мутирал AveC ген е вкарана и експресирана; (б) определяне на съотношението клас 2:1 на авермектините, получени от клетки на същия щам на *S. avermitilis* от стъпка (а), но който вместо това експресира само дивия тип aveC алел или ORF от ФИГУРА 1 (SEQ ID NO:1) или хомоложна нуклеотидна последователност; и (в) сравняване на съотношението клас 2:1 на авермектините, получени от клетки на *S. avermitilis* от стъпка (а) със съотношението клас 2:1 на авермектините, получени от клетки на *S. avermitilis* от стъпка (б); така че, когато

съотношението клас 2:1 на авермектините, получени от клетки на *S. avermitilis* от стъпка (а) е различно от съотношението клас 2:1 на авермектините, получени от клетки на *S. avermitilis* от стъпка (б), тогава е идентифицирана мутация в ORF на aveC способна да променя съотношението клас 2:1 на авермектините. В предпочитан вариант, съотношението клас 2:1 на авермектините се редуцира от мутацията.

По-нататък в предпочитан вариант, настоящето изобретение осигурява метод за идентифициране на мутации в ORF на aveC или на генетични конструкции, включващи ORF на aveC, способни да променят количеството на получените авермектини, който включва: (а) определяне на количеството на авермектините, получени от клетки на *S. avermitilis* щам, чийто нативен aveC алел е инактивиран, и в който е въведена и експресирана полинуклеотидна молекула, включваща нуклеотидна последователност, кодираща продукта на мутирал AveC ген или включваща генетичен конструкт, включващ нуклеотидна последователност, кодираща продукта на AveC гена; (б) определяне на количеството на получените авермектини от клетки на същия щам на *S. avermitilis* от стъпка (а), но който вместо това експресиращ само единичен aveC алел, който има нуклеотидна последователност на ORF от ФИГУРА 1 (SEQ ID NO:1) или нейна хомоложна нуклеотидна последователност; и (в) сравняване на количеството на получените авермектини от клетки на *S. avermitilis* от стъпка (а) с количеството на авермектините, получени от *S. avermitilis* от стъпка (б), като когато количеството на получените авермектини от клетки на *S. avermitilis* от стъпка (а) е различно от количеството на авермектините, получени от клетки на *S. avermitilis* от стъпка (б) тогава е идентифицирана мутация в ORF на aveC или генетичен конструкт, способен да променя количеството на получените авермектини. В предпочитан вариант, количеството на получените авермектини се повишава от мутацията.

05.03.02

Настоящото изобретение по-нататък осигурява рекомбинантни вектори, които се използват за създаването на нови щамове на *S. avermitilis*, с променена авермектинова продукция. Например, настоящето изобретение осигурява вектори, които могат да бъдат използвани за въвеждането на която и да е от полинуклеотидните молекули, включващи мутирала нуклеотидна последователност от настоящето изобретение, на мястото на ORF на aveC гена в хромозомата на *S. avermitilis*, които могат да бъдат вкарани в или да заместят aveC алела или ORF или част от нея, чрез хомоложна рекомбинация. Съгласно настоящето изобретение обаче, полинуклеотидна молекула включваща мутирала нуклеотидна последователност на настоящето изобретение осигурена тук, може също да функционира, като модулира биосинтезата на авермектин, когато е вкарана в хромозомата на *S. avermitilis* на различно място от aveC гена или когато е въведена епизомално в клетките на *S. avermitilis*. Така настоящето изобретение също осигурява вектори, включващи полинуклеотидна молекула, включваща мутирала нуклеотидна последователност от настоящето изобретение, които вектори могат да бъдат използвани за вкарване на полинуклеотидната молекула в място от хромозомата на *S. avermitilis* различно от мястото за aveC гена, или да бъде въведена епизомално. В предпочитан вариант, настоящето изобретение осигурява вектори за заместване на гени, които могат да бъдат използвани за вкарване на мутирал aveC алел в хромозомата на *S. avermitilis*, за създаването на нови щамове от клетки, които продуцират авермектини с редуцирано съотношение клас 2:1, в сравнение с клетки на същия шам, които вместо това експресират само дивия тип aveC алел.

Настоящото изобретение по-нататък включва методи за създаване на нови щамове на *S. avermitilis*, включващи клетки, които експресират мутирал aveC алел и които продуцират променени

съотношения и/или количества на авермектини, в сравнение с клетки на същия щам на *S. avermitilis*, който вместо това експресира само див тип aveC алел. В предпочитан вариант, настоящето изобретение осигурява метод за създаване на нови щамове на *S. avermitilis*, включващи клетки, които експресират мутирал aveC алел и които продуцират авермектини с променено съотношение клас 2:1, в сравнение с клетки на същия щам на *S. avermitilis*, който вместо това експресира само див тип aveC алел, включващ трансформирани клетки на *S. avermitilis* щам с вектор, който носи мутирал aveC алел, който кодира продукта на ген, който променя съотношението клас 2:1 на авермектините, получени от клетки на *S. avermitilis* щам, експресиращ мутирал алел, в сравнение с клетки от същия щам, които вместо това експресират само дивия тип aveC алел и селекция на трансформираните клетки, които продуцират авермектини с променено съотношение клас 2:1, в сравнение със съотношението клас 2:1 на авермектините, получени от клетки на щам, който вместо това експресира див тип aveC алел. В предпочитан вариант, съотношението клас 2:1 на получените авермектини е редуцирано в клетките на новия щам.

По-нататък, в предпочитан вариант, настоящето изобретение осигурява метод за създаване на нови щамове на *S. avermitilis*, включващи клетки, които продуцират променено количество авермектини, който включва трансформация на клетки на *S. avermitilis* щам, с вектор който носи мутирал aveC алел или с генетичен конструкт включващ aveC алела, експресията на който води до промяна в количеството на получените авермектини от клетките на *S. avermitilis* щам, експресиращи мутирал aveC алел или генетичен конструкт, в сравнение с клетки на същия щам, които вместо това експресират само дивия тип aveC алел, и селекция на трансформираните клетки, които продуцират променено количество на авермектини, в сравнение с

количеството на авермектините, получени от клетки на щам, който вместо това експресира само дивия тип *aveC* алел. В предпочитан вариант, количеството на получените авермектини е повишено в клетките на новия щам.

В друг предпочитан вариант, настоящето изобретение осигурява метод за създаване на нови щамове на *S. avermitilis*, клетките на които включват инактивиран *aveC* алел, който включва трансформация на клетки на *S. avermitilis* щам, които експресират който и да е *aveC* алел с вектор, който инактивира *aveC* алела и селекция на трансформирани клетки, в които *aveC* алела е инактивиран.

Настоящото изобретение по-нататък осигурява нови щамове на *S. avermitilis*, включващи клетки, които са трансформирани с която и да е от полинуклеотидните молекули или вектори, включващи мутирала нуклеотидна последователност от настоящето изобретение. В предпочитан вариант, настоящето изобретение осигурява нови щамове на *S. avermitilis* включващи клетки, които експресират мутирал *aveC* алел на мястото на или в допълнение към дивия тип *aveC* алел, където клетките на новия щам продуцират авермектини с променено съотношение клас 2:1, в сравнение със клетки от същия щам, които вместо това експресират само дивия тип *aveC* алел. В още по-предпочитан вариант, клетките от новия щам продуцират авермектини с редуцирано съотношение клас 2:1, в сравнение с клетки от същия щам, които вместо това експресират само дивия тип *aveC* алел. Такива нови щамове се използват за продукция на авермектини с търговско значение в широки мащаби, като например за дорамектин.

По-нататък в предпочитан вариант, настоящето изобретение осигурява нови щамове на *S. avermitilis*, включващи клетки, които експресират мутирал *aveC* алел или генетичен конструкт, включващ *aveC* алела на мястото на или в допълнение към техния нативен *aveC*

алел, което води до продукцията на променено количество на авермектини от тези клетки, в сравнение с количеството авермектини, получено от клетки на същия шам, които вместо това експресират само дивия тип *aveC* алел. В предпочитан вариант, новите клетки продуцират повишено количество авермектини.

По-нататък в предпочитан вариант, настоящето изобретение осигурява нови щамове на *S. avermitilis*, включващи клетки в които *aveC* алела е инактивиран. Такива щамове се използват за определяне на разликите в спектъра на авермектините, които те продуцират, в сравнение с тези на щама на дивия тип и за допълване на скрининг анализите, които са описани тук, за установяване дали насочения или случаен мутагенезис на *aveC* гена се отразява върху продукцията на авермектините.

Настоящото изобретение по-нататък осигурява метод за продукция на авермектини, включващ култивиране на клетки на *S. avermitilis* шам, които клетки експресират мутирал *aveC* алел, който кодира генен продукт, който променя съотношението клас 2:1 на авермектините, получени от клетки на *S. avermitilis* шам, експресиращи мутирал *aveC* алел, в сравнение с клетки от същия шам, които не експресират мутирал *aveC* алел, но вместо това експресират само дивия тип *aveC* алел в средата за култивиране, при условия, които позволяват или индуцират продукцията на авермектини от тях и повторното получаване на тези авермектини от културата. В предпочитан вариант, съотношението клас 2:1 на авермектините, получени от клетките експресиращи мутацията е редуцирано. Този метод осигурява повишена ефикасност в продукцията на авермектини с търговско значение, като дорамектин.

Настоящото изобретение по-нататък осигурява метод за продукцията на авермектини, включващ култивиране на клетки на *S.*

avermitilis шам, които клетки експресират мутирал aveC алел или генетичен конструкт, включващ aveC алел, който води до продукцията на променено количество авермектини, получени от клетки на *S. avermitilis* шам, експресиращ мутирал aveC алел или генетичен конструкт, в сравнение с клетки на същия шам, които не експресират мутирал aveC алел или генетичен конструкт, но вместо това експресират само дивия тип aveC алел, в културална среда, при условия, които позволяват или индуцират продукцията на авермектини от тях, и повторното получаване на тези авермектини от културата. В предпочитан вариант, количеството на авермектини, получени от клетките експресиращи мутацията или генетичния конструкт е повишено.

Настоящото изобретение по-нататък осигурява нов състав на авермектини, получени от шам на *S. avermitilis*, експресиращ мутирал aveC алел от настоящето изобретение, където авермектините се получават в редуцирано съотношение клас 2:1 в сравнение със съотношението на авермектините клас 2:1, получени от клетки на същия шам на *S. avermitilis*, които не експресират мутирания aveC алел, но вместо това експресират само дивия тип aveC алел. Новия авермектинов състав може да присъства като продукт на ферментацията в културалната среда или може да бъде изолиран от нея, и може да бъде частично или значително пречистен от нея.

4. КРАТКО ОПИСАНИЕ НА ФИГУРИТЕ

ФИУГРА 1. ДНК последователност (SEQ ID NO:1), включваща ORF на aveC на *S. avermitilis* и нейната производна аминокиселинна последователност (SEQ ID NO:2).

ФИГУРА 2. Плазмиден вектор pSE186 (ATCC 209604), включващ пълната ORF на *aveC* гена на *S. avermitilis*.

ФИГУРА 3. Вектор за заместване на ген pSE180 (ATCC 209605), включващ *ermE* гена на *Sacc. erythraea*, вкаран в ORF на *aveC* на *S. avermitilis*.

ФИГУРА 4. Bam HI рестриктазна карта на авермектиновия поликетид синтетазен генен клъстер на *S. avermitilis* с пет идентифицирани припокриващи се козмидни клона (т.е., pSE65, pSE66, pSE67, pSE68, pSE69). Показана е също връзката между pSE118 и pSE119.

ФИГУРА 5. HPLC анализ на продуктите на ферментацията, получени от щамове на *S. avermitilis*. Количествения пик се получава чрез сравняване със стандартни количества на циклохексил B1. Времето на задържане на циклохексил B2 е 7.4-7.7 минути, на циклохексил B1 времето на задържане е 11.9-12.3 минути. **ФИГ. 5А** *S. avermitilis* щам SE180-11 с ORF на инактивиран *aveC*. **ФИГ. 5Б** *S. avermitilis* щам SE180-11 трансформиран с pSE186 (ATCC 209604). **ФИГ. 5В.** *S. avermitilis* щам SE180-11, трансформиран с pSE187. **ФИГ. 5Г.** *S. avermitilis* щам SE180-11, трансформиран с pSE188.

ФИГУРА 6. Сравнение на производните аминокиселинни последователности, кодирани от ORF на *aveC* на *S. avermitilis* (SEQ ID NO:2), ORF на частичния хомолог на *aveC* от *S. griseochromogenes* (SEQ ID NO:5) и ORF на хомолога на *aveC* от *S. hygroscopicus* (SEQ ID NO:4). Болдираният валиновия остатък е допълнителното старт място на белтъка. Хомоложните и за трите последователности консервативни остътъци са показани с главни букви, и с по-малки букви са посочени хомоложните участъци в две от трите секвенции. Аминокиселинните последователности притежават около 50 % идентичност на секвенциите.

ФИГУРА 7. Хибриден плазмиден конструкт, носещ фрагмент BsaAI/KpnI от хомолога на aveC гена на *S. hygroscopicus* с размери 564 бд вкаран в ORF на aveC в мястото BsaAI/KpnI на *S. avermitilis*.

5. ПОДРОБНО ОПИСАНИЕ НА ИЗОБРЕТЕНИЕТО

Настоящото изобретение се отнася до идентифицирането и характеризирането на полунуклеотидни молекули, които имат нуклеотидни последователности, кодиращи продукта на AveC гена на *Streptomyces avermitilis*, до конструирането на нови щамове на *S. avermitilis*, които могат да бъдат използвани за скриниране на продуктите на мутирания AveC ген, за техния ефект върху продукцията на авермектини и за откритието че дадена мутация в AveC гена води до продукти с редуцирано съотношение B2:B1 на авермектините, получени от *S. avermitilis*. Чрез дадените примери, изобретението е описано в дадените по-долу глави, като полинуклеотидна молекула с нейната нуклеотидна последователност, като последователността на плазмид pSE186 (ATCC 209604), която кодира продукта на AveC гена на *S. avermitilis* или като нуклеотидната последователност на ORF от ФИГУРА 1 (SEQ ID NO:1), и като полинуклеотидни молекули, с произход от тях, които имат имат мутации в нуклеотидните последователности или в изродените техни варианти. Застъпените в настоящето изобретение принципи обаче могат да бъдат аналогично приложени към други полинуклеотидни молекули, включващи хомолози на aveC гените от други измежду видовете *Streptomyces* включително напр. *S. hygroscopicus* и *S. griseochromogenes*.

5.1. ПОЛИНУКЛЕОТИДНИ МОЛЕКУЛИ КОДИРАЩИ

AveC ГЕННИЯ ПРОДУКТ НА *S. AVERMITILIS*

Настоящото изобретение осигурява изолирана полинуклеотидна молекула, включваща пълната ORF на *aveC* на *S. avermitilis* или съществена част от нея, за която изолирана полинуклеотидна молекула *in situ* е установено, че липсва следващата пълна ORF, която е локализирана в хромозомата на *S. avermitilis* преди ORF на *aveC*.

Изолираната полинуклеотидна молекула от настоящето изобретение, за предпочитане включва нуклеотидна последователност, която да е същата като тази на плазмид pSE186 (ATCC 209604), кодираща продукта на AveC гена, или същата нуклеотидна последователност на ORF от ФИГУРА 1 (SEQ ID NO:1) или съществена част от нея. Както е използвана тук “съществена част” от изолирана полинуклеотидна молекула включваща нуклеотидна последователност, кодиращата продукта на AveC гена на *S. avermitilis*, означава изолирана полинуклеотидна молекула, включваща най-малко 70 % от пълната последователност на ORF на *aveC* показана на ФИГУРА 1 (SEQ ID NO:1) и която кодира функционален еквивалент на AveC генния продукт. В този смисъл “функционален еквивалент” на AveC генния продукт се дефинира като генен продукт който когато се експресира в *S. avermitilis* щам ATCC 53692, в който нативния *aveC* алел е инактивиран, води до продукция на съществено същото съотношение и количество на авермектините, получени от *S. avermitilis* щам ATCC 53962, който вместо това експресира само дивия тип, нативен функционален *aveC* алел на *S. avermitilis* щам ATCC 53692.

В допълнение към нуклеотидната последователност на ORF на *aveC*, изолираната полинуклеотидна молекула от настоящето

изобретение може по-нататък да включва нуклеотидни последователности за които *in situ* е установено, че граничат с aveC гена на *S. avermitilis*, както съседните нуклеотидни последователности показани на ФИГУРА 1 (SEQ ID NO:1).

Настоящото изобретение по-нататък осигурява изолиране на полинуклеотидна молекула, включваща нуклеотидна последователност SEQ ID NO:1 или изроден неин вариант.

Както се използват тук, термините “полинуклеотидна молекула”, “полинуклеотидна последователност”, “кодираща последователност”, “отворена рамка на четене” и “ORF” могат да бъдат отнесени до ДНК и РНК молекули, които могат да бъдат едноверижни или двуверижни, и които могат да бъдат транскрибирани или транслирани (ДНК) или транслирани (РНК) като продукт на AveC гените, или както е описано по-долу като продукт на гена хомоложен на AveC, или като полипептид който е продукт на гена хомоложен на AveC, или като продукт на гена хомоложен на AveC експресиран в подходяща система от клетки-гостоприемници, когато е поставен под контрола на подходящи регулаторни елементи. Кодираща последователност без да се ограничава до, може да включва прокариотни последователности, кДНК последователности, геномни ДНК последователности и химично синтезирани ДНК и РНК последователности.

Нуклеотидната последователност, показана на ФИГУРА 1 (SEQ ID NO:1) включва четири различни GTG кодона и нуклеотидни двойки (нд) в позиции 42, 174, 177 и 180. Както е описано по-долу в Глава 9 конструирани са много делеции в 5' района на ORF на aveC (ФИГУРА 1; SEQ ID NO:1) за да помогнат да се определи кой от тези кодони биха могли да функционират в ORF на aveC като стартови места за експресията на белтък. Делеция от първото GTG място в базова

05.03.02

двойка (бд) 42 не подтиска активността на AveC. Допълнителна делеция на другите GTG кодони едновременно в позиции на бд 174, 177, 180 подтискат изцяло активността на AveC, което показва че този район е необходим за експресията на белтък. Така настоящето изобретение обхваща вариабълна област на ORFs на aveC.

Настоящото изобретение по-нататък осигурява полинуклеотидна молекула, която има нуклеотидна последователност, хомоложна на тази от плазмид pSE186 (ATCC 209604) кодираща продукта на AveC гена на *S. avermitilis*, или на нуклеотидната последователност на ORF на aveC представена на ФИГУРА 1 (SEQ ID NO:1) или на съществена част от нея. Термина "хомоложен", когато се използва за да се отнесе до полинуклеотидна молекула, хомоложна на нуклеотидната последователност, кодираща продукта на AveC гена, означава полинуклеотидна молекула, която има нуклеотидна последователност: (а) която кодира същия продукт на AveC гена, като нуклеотидната последователност на плазмид pSE186 (ATCC 209604), кодираща продукта на AveC гена на *S. avermitilis*, или същия продукт като този на нуклеотидната последователност на ORF на aveC, представена на ФИГУРА 1 (SEQ ID NO:1), но който включва една или повече тихи мутации в нуклеотидната последователност, отнасящи се до изродеността на генетичния код (т.е. изроден вариант); или (б) която хибридизира с комплементарната част на полинуклеотидна молекула, която има нуклеотидна последователност кодираща аминокиселинна последователност, кодирана от последователността на плазмид pSE186 (ATCC 209604), кодираща продукта на AveC ген, или която кодира аминокиселинната последователност, показана на ФИГУРА 1 (SEQ ID NO:2), в условия на умерено специфична хибридизация, т.е. хибридизация към ДНК пренесена върху филтър при условия - 0.5 M NaHPO₄, 7% натриев додецил сулфат (SDS), 1mM ЕДТА при 65 ° C и

промиване в 0.2xSSC/0.1 % SDS при 42 ° C (виж Ausubel et al. (eds.), 1989, Current Protocols in Molecular Biology, Vol.1, Green Publishing Associates, Inc., and John Willey & Sons, Inc, New York, at p. 2.10.3) и кодираща функционален еквивалент на продукта на AveC гена, както е дефинирано по-горе. В предпочитан вариант, хомоложната полинуклеотидна молекула хибридира към комплементарната нуклеотидна последователност на плазмид pSE186 (ATCC 209604), кодираща продукта на AveC гена или към комплементарната нуклеотидна последователност на ORF на aveC, представена на ФИГУРА 1 (SEQ ID NO:2) или към съществена част от нея, при условия на високо специфична хибридизация, т.е. към ДНК пренесена върху филтър при условия - 0.5 M NaHPO₄, 7% SDS, 1mM EDTA при 65 ° C и промиване в 0.1xSSC/0.1 % SDS при 68 ° C (Ausubel et al., 1989 виж по-горе) и кодираща функционален еквивалент на продукта на AveC гена, както е дефиниран по-горе.

Активността на продукта на AveC гена и неговите потенциални функционални еквиваленти могат да бъдат определени, чрез HPLC анализ на продуктите на ферментацията, както е описано в примерите по-долу. Полинуклеотидни молекули, които имат последователности, които кодират функционални еквиваленти на продукта на AveC гена на *S. avermitilis*, включват естествено възникнали aveC гени, присъстващи в други щамове на *S. avermitilis*, хомоложни aveC гени, присъстващи в други видове на *Streptomyces* и мутирани aveC алели, независимо дали са възникнали спонтанно или са конструирани.

Настоящото изобретение по-нататък осигурява полинуклеотидна молекула, включваща нуклеотидна последователност, която кодира полипептид, който има аминокиселинна последователност хомоложна на аминокиселинната последователност, кодирана от

последователността на плазмид pSE186 (ATCC 209604), кодираща продукта на AveC гена или аминокиселинна последователност от ФИГУРА 1 (SEQ ID NO:2) или съществена част от нея. Както се използва тук "съществена част" от аминокиселинната последователност от ФИГУРА 1 (SEQ ID NO:2) означава полипептид включващ най-малко около 70 % от аминокиселинната последователност, показана на ФИГУРА 1 (SEQ ID NO:2) и която представлява функционален еквивалент на продукта на AveC гена, както е дефиниран по-горе.

Както се използва тук терминът "хомоложен" отнесен към аминокиселинните последователности, хомоложни на аминокиселинните последователности на продукта на AveC гена на *S. avermitilis*, се отнася до полинуклеотид, който в други случаи има аминокиселинна последователност от ФИГУРА 1 (SEQ ID NO:2), но в който един или повече аминокиселинни остатъка са консервативно заместени с различен аминокиселинен остатък, където тази аминокиселинна последователност има най-малко около 70 %, за предпочитане най-малко около 80 %, и още по-предпочитана с най-малко около 90 % идентичност на аминокиселинната последователност, кодирана от плазмид pSE186 (ATCC 209604), кодиращ продукта на AveC гена, или аминокиселинна последователност от ФИГУРА 1 (SEQ ID NO:2) както е определено от алгоритъма за идентичност на всяка стандартна аминокиселинна последователност, като BLASTP алгоритъма (GENBANK, NCBI) и където това консервативно заместване води до функционален еквивалент на генния продукт, както е дефинирано по-горе. Консервативните аминокиселинни замествания са добре познати в областта. Правилата за създаване на такива замествания включват сред другите и тези описани от Dayhof, M.D., 1978, Nat.Biomed.Res.Found, Washington, D.C., Vol. 5, Sup. 3. По-специално, консервативни аминокиселинни замествания са тези, които

обикновено се получават между семейство от аминокиселини, близки по своята киселинност или полярност. Генетично кодираните аминокиселини обикновено се разделят на четири групи: (1) кисели = аспартат, глутамат; (2) основни = лизин, аргинин, хистидин; (3) неполярни = аланин, валин, левцин, изолевцин, пролин, фенилаланин, метионин, триптофан; и (4) незаредени, полярни = глицин, аспаргин, глутамин, цистеин, серин, треонин, тирозин. Фенилаланина, триптофана и тирозина също се класифицират заедно, като ароматни аминокиселини. Едно или повече замествания във всяка една от групите, напр. левцин с изолевцин или валин, или аспартат с глутамат, или треонин със серин, или който и да е друг аминокиселинен остатък със структурно аналогичен аминокиселинен остатък, напр. аминокиселинен остатък с подобна киселинност или полярност, или със комбинация от тях, обикновено ще има незначителен ефект върху функцията на полипептида.

Настоящото изобретение по-нататък осигурява изолирана полинуклеотидна молекула, включваща нуклеотидна последователност, кодираща продукта на AveC гена. Както се използва тук "Продукта на хомолога на AveC гена" се дефинира като генен продукт, имащ най-малко около 50% аминокиселинна идентичност с продукта на AveC гена на *S. avermitilis*, включващ аминокиселинна последователност, кодирана от последователността на плазмид pSE186 (ATCC 209604), кодираща продукта на AveC гена или аминокиселинна последователност, показана на ФИГУРА 1 (SEQ ID NO:2), както е определено от стандартен алгоритъм на идентичност за всяка една аминокиселинна последователност, какъвто е BLASTP алгоритъмът (GENBANK, NCBI). В неограничен вариант продуктът на хомолога на AveC гена е от *S. hygroscopicus* (описан в ЕР приложение 0298423; депозит FERM - BP-1901) и включва аминокиселинна последователност

05.03.00
24

SEQ ID NO:4 или съществена част от нея. “Съществена част” от аминокиселинната последователност SEQ ID NO:4 означава полипептид, включващ най-малко около 70 % от аминокиселинната последователност на SEQ ID NO:4 и която да представлява функционален еквивалент на продукта, на хомолога на AveC гена. “Функционален еквивалент” на продукта на хомолога на AveC гена е дефиниран като генен продукт, който когато се експресира в *S. hygroscopicus* щам FERM BP-1901 в който хомолога на нативния aveC алел е инактивиран, води до продукцията на съществено същото съотношение и количество на милбемицини, получени от *S. hygroscopicus* щам FERM BP-1901, който вместо това експресира само дивия тип нативен функционален хомолог на aveC алела на *S. hygroscopicus* щам FERM BP-1901. В неограничен вариант, изолираната полинуклеотидна молекула от настоящето изобретение, която кодира продукта на хомолога на AveC гена на *S. hygroscopicus* включва нуклеотидната последователност SEQ ID NO:3 или съществена част от нея. В тази връзка “съществена част” от изолираната полинуклеотидна молекула, включваща нуклеотидната последователност SEQ ID NO:3 означава изолирана полинуклеотидна молекула, включваща най-малко 70 % от нуклеотидната последователност на SEQ ID NO:3 и която кодира функционален еквивалент на продукта на хомолога на AveC гена, както е дефинирано непосредствено по-горе.

Настоящото изобретение по-нататък осигурява полинуклеотидна молекула, включваща нуклеотидна последователност, която е хомоложна на нуклеотидната последователност SEQ ID NO:3 на *S. hygroscopicus*. Терминът “хомоложен”, когато се използва за да се отнесе до полинуклеотидна молекула, включваща нуклеотидна последователност, която е хомоложна на хомолога на AveC гена на *S. hygroscopicus*, кодираща продукта на последователност SEQ ID NO:3

означава полинуклеотидна молекула, която има нуклеотидна последователност (а) която кодира същия генен продукт като нуклеотидната последователност SEQ ID NO:3, но която включва една или повече тихи мутации в нуклеотидната последователност, отнесени като изроденост на генетичния код (т.е. изроден вариант); или (б) която хибридира с комплементарна полинуклеотидна молекула, която има нуклеотидна последователност, която кодира аминокиселинна последователност SEQ ID NO:4 при условия на високо специфична хибридизация т.е. хибридизация на ДНК, прехвърлена върху филтър при следните условия - 0.5 M NaHPO₄, 7% SDS, 1mM EDTA при 65 ° C и промиване в 0.2xSSC/0.1 % SDS при 42 ° C (виж Ausubel et al. по-горе) и кодираща функционален еквивалент на продукта на хомолога на AveC гена, както е дефинирано по-горе. В предпочитан вариант, хомоложната полинуклеотидна молекула хибридира с комплементарната нуклеотидна последователност на хомолога на AveC гена SEQ ID NO:3, при условия на високо специфична хибридизация, т.е. хибридизация с ДНК прехвърлена върху филтър, при следните условия - 0.5 M NaHPO₄, 7% SDS, 1mM EDTA при 65 ° C и промиване в 0.1xSSC/0.1 % SDS при 68 ° C (Ausubel et al., 1989, по-горе) и кодираща функционален еквивалент на продукта на хомолога на AveC гена, както е дефиниран по-горе.

Настоящото изобретение по-нататък осигурява полинуклеотидна молекула, включваща нуклеотидна последователност, кодираща полипептид, който е хомоложен на продукта на хомолога на AveC гена на *S. hygroscopicus*. Както се използва тук, отнасящ се до полипептиди, които са хомоложни на продукта на хомолога на AveC гена от *S. hygroscopicus*, SEQ ID NO:4, термина "хомоложен" се отнася до полипептид, който в други случаи има аминокиселинна последователност SEQ ID NO:4, но в който един или повече

аминокиселинни остатъка са консервативно заместени с различни аминокиселинни остатъци, както е дефинирано по-горе, където тази аминокиселинна последователност има най-малко около 70 %, за предпочитане да бъде най-малко около 80 %, по-предпочитана да бъде с най-малко около 90 % аминокиселинна идентичност с полипептида от SEQ ID NO:4, която е определена чрез стандартен алгоритъм за идентичност на аминокиселинни последователности, като BLASTP алгоритъма (GENBANK, NCBI) и където такива консервативни замествания водят до функционален еквивалент на продукта на хомолога на AveC гена, както е дефиниран по-горе.

Настоящото изобретение по-нататък осигурява олигонуклеотиди, които хибридизират с полинуклеотидна молекула, имаща нуклеотидна последователност от ФИГУРА 1 (SEQ ID NO:1) или SEQ ID NO:3, или с полинуклеотидна молекула имаща нуклеотидна последователност, която е комплементарната на нуклеотидната последователност от ФИГУРА 1 (SEQ ID NO:1) или SEQ ID NO:3. Такива олигонуклеотиди са с дължина най-малко около 10 нуклеотида, за предпочитане с дължина от около 15 нуклеотида до около 30 нуклеотида и хибридизират с една от споменатите полинуклеотидни молекули при условия на високо специфична хибридизация, т.е. промиване в 6xSSC/0.5% натриев пирофосфат при около 37 ° C за около 14-базови олигонуклеотиди, при около 48 ° C за 17-базови олигонуклеотиди и при около 55 ° C за 20-базови олигонуклеотиди, и при 60 ° C за 23-базови олигонуклеотиди. В предпочитан вариант олигонуклеотидите са комплементарни на част от гореспоменатите полинуклеотидни молекули. Тези олигонуклеотиди се използват за разнообразни цели, включително да кодират или да действат като анти-сенс молекули, използвани за генна регулация или като праймери за

05.03.02

амплифициране на aveC или хомолози на aveC кодиращите полинуклеотидни молекули.

Допълнителен хомолог на aveC гена може да бъде идентифициран в други видове или щамове *Streptomyces*, чрез използване на полинуклеотидни молекули или олигонуклеотиди описани тук във връзка с известните техники. Например, олигонуклеотидна молекула, включваща част от нуклеотидната последователност на *S. avermitilis* от ФИГУРА 1 (SEQ ID NO:1) или част от нуклеотидната последователност SEQ ID NO:3 на *S. hygroscopicus* може да бъде видимо белязана и да бъде използвана за скрининг на геномна библиотека, конструирана от ДНК с произход от изследвания организъм. Специфичността на условията на хибридикация се избира на базата на родствени връзки между съответните организми, в този случай *S. avermitilis* или *S. hygroscopicus* и изследвания организъм. Изискванията за различните условия на специфичност са добре известни на специалистите в областта, и тези условия ще варират предвидимо, в зависимост от спецификата на организмите от които библиотеката и белязаните секвенции произхождат. Предпочитани са такива олигонуклеотиди с дължина най-малко 15 нуклеотида и включващи, например тези описани в примерите по-долу. Амплификация на хомоложни гени може да се осъществи, чрез използване на тези и други олигонуклеотиди, чрез прилагане на стандартни техники, като полимеразна верижна реакция (PCR), въпреки че и други техники за амплификация са известни в областта, например лигазната верижна реакция също може да бъде използвана.

Клонове идентифицирани, че съдържат хомоложни нуклеотидни последователности на aveC могат да бъдат тествани за тяхната способност да кодират функционални продукти на хомолога на AveC гена. За тази цел, клоновете могат да се анализират чрез

секвениране, за да се идентифицират подходящите рамки на четене, както и сигналите за инициация и терминация. Обратно или в допълнение, клонираната ДНК секвенция може да бъде вкарана в подходящ експресионен вектор, т.е. вектор, който носи необходимите елементи за транскрипция и трансляция на въведената белтък-кодираща последователност. Всякакви разнообразни системи гостоприемник/вектор могат да бъдат използвани, както е описано по-долу, включващи но не и ограничени до бактериални системи, като плазмидни, бактериофагови, или козмидни експресионни вектори. Подходящи клетки-гостоприемници, трансформирани с такива вектори включват потенциален хомолог на aveC, кодиращ последователност, която може след това да бъде анализирана за AveC-тип активност, чрез използване на методи като HPLC анализ на продуктите на ферментацията, както е описано например в Глава 7, по-долу.

Получаването и манипулация на полинуклеотидните молекули, описани тук са в обхвата на специалистите в областта и могат да бъдат извършени съгласно рекомбинантните техники описани, напр. в Maniatis, et al., 1989, Molecular Cloning, A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY; Ausbel, et al., 1989, Current Protocols in Molecular Biology, Green Publishing Associates & Wiley Interscience, NY; Sambrook, et al., 1989, Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 2d ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY; Innis et al. (eds), 1995. PCR Strategies, Academic Press, Inc., San Diego; and Erlich (ed), 1992. PCR Technology, Oxford University Press, New York, всички включени тук в литературната справка. Полинуклеотидни клонове, кодиращи генните продукти на AveC гена или продуктите на хомолога на AveC гена могат да бъдат идентифицирани, чрез използване на методи известни в областта, включващи, но не и ограничени до методите изложени в Глава 7 по-

долу. Геномни ДНК библиотеки могат да бъдат скринирани за aveC и хомоложни на aveC кодиращи последователности, чрез използване на техники, като методите изложени в Beneton and Davis, 1977, Science 196:180 за бактериофагови библиотеки и Proc. Natl., Acad. Sci. USA, 72:3961-3965 за плазмидни библиотеки. Полинуклеотидни молекули, имащи нуклеотидни последователности известни с това че включват ORF на aveC, представена например в плазмид pSE186 (ATCC 209604), или в плазмид pSE119 (описан в Глава 7, по-долу) могат да бъдат използвани като сонди в тези скрининг експерименти. Обратно, олигонуклеотидни сонди могат да бъдат синтезирани, които отговарят на нуклеотидните последователности и частичните или пълни производни аминокиселинни последователности на пречистения пордукт на хомолога на AveC гена.

5.2. РЕКОМБИНАНТНИ СИСТЕМИ

5.2.1. ВЕКТОРИ ЗА КЛОНИРАНЕ И ЕКСПРЕСИЯ

Настоящото изобретение по-нататък осигурява рекомбинантни вектори за клониране и експресия, които се използват за клониране или експресия на полинуклеотидните молекули от настоящето изобретение, включващи например ORF на aveC на *S. avermitilis* или който и да е хомолог на ORF на aveC. В неограничен вариант, настоящето изобретение осигурява плазмид pSE186 (ATCC 209604), който включва пълната ORF на aveC гена на *S. avermitilis*.

Всички следващи описания, се отнасят до ORF на aveC на *S. avermitilis* или на полинуклеотидна молекула включваща ORF на aveC на *S. avermitilis* или част от нея, или продукт на aveC гена на

S. avermitilis, който също се отнася до хомолози на *aveC* гена и до продукти на хомолога на *AveC* гена, без да е посочен конкретно или в контекста.

Разнообразие от различни вектори са изработени за специфично използване в *Streptomyces*, включващи фагови вектори, плазмиди мултиплициращи се в много копия, плазмиди мултиплициращи се в малко копия и *E.coli-Streptomyces* "shuttle"-вектори сред другите, и всички те могат да бъдат използвани в практиката на настоящето изобретение. Голям брой гени за резистентност към лекарствени препарати също са клонирани от *Streptomyces* и някои от тези гени са въведени във вектори като маркери за селекция. Примери за понастоящем използвани вектори за използване в *Streptomyces* са представени между другите в Hutchinson, 1980, Applied Biochem. Biotech. 16:169-190.

Рекомбинантни вектори от настоящето изобретение, по-специално експресионни вектори, за предпочитане са конструирани така, че кодиращата последователност на полинуклеотидната молекула от изобретението е ориентирана в оперативна асоциация с един или повече регулаторни елементи на транскрипция или транслация на кодиращата последователност за продукция на полипептид. Както е използван тук, терминът "регулаторен елемент" включва, но не се ограничава до нуклеотидни последователности, които кодират индуцируеми и не-индуцируеми промотори, енхансери, оператори и други елементи известни в областта, които служат за да осъществят и/или регулират експресията на полинуклеотидните кодиращи последователности. Също както се използва тук, кодиращата последователност е в "оперативна асоциация" с един или повече регулаторни елементи, където регулаторните елементи ефективно

регулират и позволяват транскрипцията на кодиращата последователност или транслацията на нейната мРНК или и на двете.

Типични плазмидни вектори, които могат да бъдат конструирани така че да съдържат полинуклеотидна молекула от настоящето изобретение включват сред много други pCR-Blunt, pCR2.1 (Invitrogen), pGEM3Zf (Promega) и "shuttle"-вектора pWHM3 (Vara et al., 1989, J. Bact. 171:5872-5881).

Методите за конструиране на рекомбинантни вектори, съдържащи специфична кодираща последователност в оперативна асоциация с подходящи регулаторни елементи са добре известни в областта и могат да бъдат използвани в практиката на настоящето изобретение. Тези методи включват *in vitro* рекомбинантни техники, техники за синтез и *in vivo* генетични рекомбинации. Виж например техниките описани в Maniatis et al., 1989, по-горе; Ausbel et al., 1989, по-горе, Sambrook et al., 1989, по-горе, и Erlich, 1992, по-горе.

Регулаторните елементи на тези вектори могат да варират по тяхната сила и специфичност. В зависимост от това какво използва системата клетка-гостоприемник/вектор, всякакъв брой подходящи елементи на транскрипцията и транслацията могат да бъдат използвани. Неограничаващи примери за транскрипционни регулаторни райони или промотори на бактерии включват β -gal промотора, T7 промотора, TAC промотора, десния и левия λ промотор, trp и lac промоторите, trp-lac рекомбинантните промотори и по-специално промоторите на *Streptomyces* - ermE, melC и tirA, и т.н. В специфичен вариант, описан в Глава 11 по-долу, е създаден експресионен вектор, който съдържа ORF на aveC, клониран в съседство със силно конститутивния ermE промотор от *Saccharopolyspora erythraea*. Векторът е трансформиран в *S. avermitilis* и последващия HPLC анализ на продуктите на ферментацията показва увеличен титър на получените авермектини, в

сравнение с продукцията от същия шам, но който вместо това експресира дивия тип aveC алел.

Експресионни вектори за рекомбинантен белтък могат да бъдат използвани за експресията на AveC генен продукт - рекомбинантен белтък на AveC гена. Пречистеният рекомбинантен белтък може да бъде използван за да се увеличи количеството на продукта на AveC гена в антисерум, който се използва за изучаване на биохимичните характеристики на продукта на AveC гена, за конструиране на рекомбинантен белтък на AveC с различни биохимични активности или да се подпомогне идентифицирането или пречистването на експресирания продукт на AveC гена. Възможен експресионен вектор за рекомбинантен белтък включва, но не е ограничен до вектори в които са въведени секвенции, които кодират β -галактозидазния и trpE рекомбинантни белтъци, малтоза-свързаните рекомбинантни белтъци, глутатион-S-трансферазните рекомбинантни белтъци и полихистидиновите рекомбинантни белтъци (в районите на носителя). Във друг вариант, генен продукт на AveC или част от него, може да бъде рекомбиниран към хомолог на генния продукт на AveC, или към част от него, произхождаща от други видове или щамове на *Streptomyces*, като например *S. hygroscopicus* или *S. griseochromogenes*. В специфичен вариант описан в Глава 12 по-долу и показан на ФИГУРА 7, е конструиран химерен плазмид, който съдържа район от 564 нд на ORF на хомолога на aveC гена от *S. hygroscopicus* на мястото на хомоложния район от 564 нд на ORF на aveC гена на *S. avermitilis*. Такива хибридни вектори могат да бъдат трансформирани в клетки на *S. avermitilis* и тествани за да се установи техния ефект, например върху съотношението клас 2:1 на получените авермектини.

AveC рекомбинантните белтъци могат да бъдат конструирани така, че да включват район, който се използва при пречистването им.

Например, AveC-малтоза-свързаните рекомбинантни белтъци могат да бъдат пречистени като се използва амилозна смола, AveC-глутатион-S-трансферазните рекомбинантни белтъци могат да бъдат пречистени, като се използват глутатион-агарозни носители; и AveC-полихистидин рекомбинантните белтъци могат да бъдат пречистени, като се използва двувалентна никелова смола. От друга страна, антитела срещу белтъка-носител или пептида могат да бъдат използвани за пречистване на рекомбинантните белтъци, чрез афинитетна хроматография. Например, нуклеотидна последователност, кодираща прицелния епитоп на моноклонално антитяло, може да бъде конструиран в експресионен вектор в оперативна асоциация с регулаторните елементи и да бъде разположен така че експресирания епитоп да се рекомбинира с полипептида на AveC. Например нуклеотидна последователност, кодираща tag епитопа на FLAGTM (International Biotechnologies Inc.), който е хидрофилен пептиден маркер, може да бъде вкарана чрез стандартни техники в експресионен вектор в съответната точка, например към карбоксилния край на AveC полипептида. Експресирания рекомбинантен продукт полипептид AveC-FLAGTM епитоп, може след това да бъде доказан и афинитетно пречистен, чрез използване на търговско достъпни анти-FLAGTM антитела.

Експресионен вектор, кодиращ AveC рекомбинантен белтък може също да бъде конструиран да съдържа полилинкерни последователности, които кодират специфични места за протеазно рязане, така че експресирания AveC полипептид може да се освободи от областта на носителя или рекомбинантния партньор, чрез третиране със специфична протеаза. Например, вектора носещ рекомбинантния белтък може да включва измежду другите ДНК последователност, кодираща протеазните места за тромбин или фактор Ха .

Сигнална последователност, разположена след и в рамката на четене, заедно с ORF на *aveC* може да бъде конструирана в експресионния вектор, чрез познати методи, за да насочи трафика и секрецията на експресирания генен продукт. Неограничаващи примери за сигнални последователности включват измежду другите тези за α -фактор, за имуноглобулини, за протеини, разположени по външната повърхност на мембраната, за пелициниазата и за Т-клетъчни рецептори.

За да се подпомогне селекцията на клетки-гостоприемници, трансформирани или трансфектирани с вектори за клониране или експресия от настоящето изобретение, векторът може да бъде конструиран така, че по-нататък да включва кодираща последователност за продукт на "гени - маркери" или друг селективен маркер. Такава кодираща последователност е за предпочитане и е в оперативна асоциация с кодиращите последователности за регулаторени елементи, както е описано по-горе. "Гени - маркери", които са използвани в изобретението са добре известни в областта и включват измежду другите тези, кодиращи зеления флуоресцентен белтък (GFP), гена за луциферазата, *hylE* и гена за тирозиназата. Нуклеотидни последователности, кодиращи маркери за селекция са добре известни в областта и включват тези, кодиращи генни продукти, отговарящи за резистентност към антибиотици или анти-метаболити, или тези отговорни за ауксотрофните изисквания. Примери за такива последователности, включват сред другите тези, кодиращи резистентност към еритромицин, тиострептон или канамицин.

5.2.2. ТРАНСФОРМАЦИЯ НА КЛЕТКИ-ГОСТОПРИЕМНИЦИ

Настоящото изобретение по-нататък осигурява трансформирани клетки-гостоприемници, включващи полинуклеотидна молекула или рекомбинантен вектор от изобретението и нови щамове или клетъчни линии, произхождащи от тях. Клетките-гостоприемници, които се използват в практиката на изобретението за предпочитане са клетки на *Streptomyces*, въпреки че други прокариотни или еукариотни клетки могат също да бъдат използвани. За такива трансформирани клетки-гостоприемници, е типично че включват сред другите, но не се ограничават до микроорганизми, такива като бактерии трансформирани с рекомбинантна бактериофагова ДНК, плазмидна ДНК или козмидни ДНК-ови вектори, или дрожди трансформирани с рекомбинантни вектори.

Полинуклеотидните молекули от настоящето изобретение са предназначени да функционират в клетки на *Streptomyces*, но могат също така да бъдат трансформирани в други бактериални или еукариотни клетки, например с цел клониране или експресия. Като типичен може да се използва *E.coli* щам, като например щама DH5 α , доставен от American Type Culture Collection (ATCC), Rockville, MD, USA (Номер за достъп № 31343) и от търговски източници (Stratagene). Предпочитани еукариотни клетки-гостоприемници включват дрождеви клетки, въпреки че клетки на бозайници или клетки на насекоми могат също да бъдат използвани ефективно.

Рекомбинантният експресионен вектор от изобретението за предпочитане е трансформиран или трансфектиран в един или повече типове клетки-гостоприемници, представени от значително хомогенна култура от клетки. Експресионният вектор обикновено е вкаран в клетки-гостоприемници, съгласно познати техники, като например чрез

протопластна трансформация, преципитация с калциев фосфат, третиране с калциев хлорид, микроинжектиране, електропорация, трансфекция чрез заразяване с рекомбинантен вирус, трансфекция медирана от липозоми, трансфекция с DEAE-декстран, трансдукция, конюгация или чрез бомбандиране с микроскопични метални частици. Селекция на трансформантите може да бъде направена чрез стандартни процедури, както селекцията на клетки, експресиращи селективен маркер, например за резистентност към антибиотик, свързан с рекомбинантния вектор, както е описано по-горе.

Веднъж вкаран експресионният вектор в клетката гостоприемник, интеграцията в хромозомата на клетката-гостоприемник или епизомално подържаната *aveC* кодираща последователност може да бъде потвърдена чрез стандартни техники, например чрез анализ със Southern блот хибридизация, анализ с рестриктазни ензими, PCR анализ, включително и обратно транскриптазен PCR (rt-PCR) или чрез имунологичен анализ за детекция на очакваните генни продукти. Клетките гостоприемници носещи и/или експресиращи рекомбинантна *aveC* кодираща последователност, която може да бъде идентифицирана чрез най-малко четири общоприети подхода, които са добре известни в областта, включително: (i) хибридизации на ДНК-ДНК, ДНК-РНК или РНК-антисенс-РНК; (ii) функционална детекция на присъствието на "маркерните" генни; (iii) оценка на нивото на транскрипция, измерено чрез експресията на *aveC*-специфични мРНК транскрипти в клетките-гостоприемници; и (iv) детекция на присъствието на зрял полипептиден продукт, измерен например чрез имуноанализ или чрез наличието на AveC биологична активност (например продукцията на специфичните съотношения и количества на авермектини са показатели за активността на AveC, например в клетки-гостоприемници на *S. avermitilis*).

5.2.3. ЕКСПРЕСИЯ И ХАРАКТЕРИЗИРАНЕ **НА РЕКОМБИНАНТЕН AveC ГЕНЕН ПРОДУКТ.**

Веднъж когато aveC кодиращата последователност е стабилно въведена в подходящи клетки-гостоприемници, трансформираната клетка-гостоприемник се размножава и образува колонии, и получените клетки могат да бъдат оставени да растат при условия, водещи до максимална продукция на AveC генния продукт. Такива условия обикновено включват отглеждане на клетките до достигане на висока плътност. Там където експресионният вектор включва индуцируем промотор, са ангажирани подходящи условия, необходими за индуцирането на експресия, като например температурна промяна, използване на среда, бедна на хранителните вещества, добавяне на индуциращи агенти, индуциращи получаването на “несъществени” продукти (например аналози на въглехидратите, като изопропил- β -D-тиогалактопиранозид (IPTG)), акумулиране на крайни и вторични метаболити или други подобни.

Там където експресирания AveC генен продукт остава в клетките гостоприемници, клетките се събират и лизират, и продукта се изолира, пречиства се от лизата в условия за екстракция, известни в областта, които намаляват до минимум белтъчната деградация, като например при 4 °C или в присъствието на протеазни инхибитори, или и двете. Там където експресирания AveC генен продукт се секретира от клетките-гостоприемници, средата бедна на хранителните вещества може просто да бъде събрана и продукта да бъде изолиран от нея.

Експресираният AveC генен продукт може да бъде изолиран и значително пречистен от клетъчни лизати или от хранителната среда, в зависимост от подхода, чрез използване на стандартни методи, включващи но не и ограничени до каквато и да е комбинация от

следните методи: преципитация с амониев сулфат, разделяне в зависимост от размера, йонообменна хроматография, HPLC, центрофугиране в плътностен градиент и афинитетна хроматография. Където експресирания AveC генен продукт показва биологична активност, нарастващата чистотата на препарата може да се следи на всяка стъпка от процедурата на пречистване, чрез използване на подходящ анализ. Независимо дали AveC генният продукт показва биологична активност, той може да бъде детектиран например на базата на размера или реактивността с антитяло, специфично обаче за AveC или в зависимост от присъствието на рекомбинантен tag. Както се използва тук, AveC генният продукт е "значително пречистен", където продукта представлява повече от около 20 тегловни % от протеина в един отделен препарат.

Настоящото изобретение по този начин осигурява рекомбинантно експесиран, изолиран или значително пречистен AveC генен продукт на *S. avermitilis*, включващ аминокиселинна последователност, кодирана от последователността на плазмид pSE186 (ATCC 209604), кодираща продукта на AveC гена или аминокиселинната последователност от ФИГУРА 1 (SEQ ID NO:2) или съществена част от нея и нейните хомолози.

Настоящото изобретение по-нататък осигурява рекомбинантно експесиран изолиран или значително пречистен продукт на хомолога на Ave C гена, включващ аминокиселинна последователност със SEQ ID NO:4 или съществена част от нея и нейни хомолози.

Настоящото изобретение по-нататък осигурява метод за продукция на AveC генния продукт, включващ култивиране на клетки-гостоприемници, трансформирани с рекомбинантен експесионен вектор, този вектор включва полинуклеотидна молекула, която има

нуклеотидна последователност, кодираща AveC генния продукт, която полинуклеотидна молекула е в оперативна асоциация с един или повече регулаторни елементи, които контролират експресията на полинуклеотидната молекула в клетките-гостоприемници при условия, водещи до продукцията на рекомбинантен AveC генен продукт и до повторното получаване на AveC генния продукт от клетъчната култура.

Рекомбинантно експресирания AveC генен продукт на *S. avermitilis* се използва за различни цели, включително и за скрининг на съединения, които функционират след продукцията на AveC генния продукт и следователно модулират биосинтезата на авермектини и за производство на антитела, насочени срещу AveC генния продукт.

Веднъж получен AveC генният продукт със значителна чистота, той може да бъде характеризиран по стандартни методи, включващи SDS-PAGE, хроматография на базата на размера, анализ чрез аминокиселинно секвениране, анализ на биологична активност при продукцията на подходящи продукти от авермектиновия биосинтетичен път и т.н. Например, аминокиселинната последователност на AveC генния продукт може да бъде определена, чрез използване на стандартни техники за секвениране на пептиди. AveC генният продукт може да бъде по-нататък характеризиран, чрез анализ за хидрофилност (виж например Hopp и Woods, 1981, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 78:3824) или аналогични софтуеарни алгоритми, за определяне на хидрофобните и хидрофилните райони на AveC генния продукт. Структурен анализ може да бъде проведен, за идентифициране на райони от AveC генния продукт които притежават специфични вторични структури. Биофизични методи като рентгенова кристалография (Engstrom, 1974, Biochem. Exp. Biol. 11:7-13), компютърно моделиране (Feltterick и Zoller (eds), 1986, в: Current Communications in Molecular Biology, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY) и ядрено магнитен резонанс

(NMR) могат да бъдат използван за картиране и изучаване на местата на взаимодействие между AveC генния продукт и неговия субстрат. Информацията получена от тези изследвания може да бъде използвана за селекция на нови места за мутации в ORF на aveC с цел да се подпомогне създаването на нови щамове на *S. avermitilis*, с по-желана продукция на авермектини.

5.3. КОНСТРУИРАНЕ И ИЗПОЛЗВАНЕ НА AveC МУТАНТИ

Настоящото изобретение осигурява полинуклеотидна молекула, включваща нуклеотидна последователност, която и в други случаи е същата като тази на aveC алела на *S. avermitilis* или изроден неин вариант, или последователността на плазмида pSE186 (ATCC 209604), кодираща продукт на AveC гена или изроден неин вариант, или нуклеотидната последователност на ORF на aveC на *S. avermitilis*, която е представена на ФИГУРА 1 (SEQ ID NO:1) или изроден неин вариант, но който по-нататък включва една или повече мутации, така че клетки от *S. avermitilis* щам ATCC 53692, в които дивия тип AveC алел е инактивиран, които експресират полинуклеотидната молекула, включваща мутирала нуклеотидна последователност или изроден неин вариант, водят до получаването на различно съотношение или количество на авермектини, в сравнение с тези получени от клетки на *S. avermitilis* щам ATCC 53692, които вместо това експресират само дивия тип AveC алел.

Съгласно настоящето изобретение, такива полинуклеотидни молекули могат да бъдат използвани за създаването на нови щамове *S. avermitilis*, които показват забележима промяна в продукцията на авермектини, в сравнение със същия щам, който вместо това експресира само дивият тип aveC алел. В предпочитан вариант, такива

05.03.02

полинуклеотидни молекули се използват за създаването на нови щамове на *S. avermitilis*, които водят до получаването на редуцирано съотношение клас 2:1 на авермектини, в сравнение със същия щам, който вместо това експресира само дивият тип aveC алел. По-нататък в предпочитан вариант, такива полинуклеотидни молекули се използват за създаването на нови щамове *S. avermitilis*, които водят до получаването на повишени нива на авермектините, в сравнение със същия щам, който вместо това експресира само единичния див тип aveC алел. По-нататък в предпочитан вариант, такива полинуклеотидни молекули се използват за създаването на нови щамове *S. avermitilis*, в които aveC алелът е инактивиран.

Мутации в aveC алела или в кодиращата последователност включват всички мутации, които водят до въвеждането на една или повече аминокиселинни делеции, инсерции, или субституции (замествания) в продукта на AveC гена, или които водят до скъсяване на продукта на AveC гена, или всякакви техни комбинации и които водят до желаня резултат. Предвидено е за такива мутирали последователности на AveC алела да включват всяка изродена тяхна форма. Например, настоящето изобретение осигурява полинуклеотидни молекули, включващи нуклеотидните последователности на AveC алела или изроден негов вариант, или последователността на плазмид pSE186 (ATCC 209604), кодираща AveC генния продукт или изроден вариант, или нуклеотидната последователност на ORF на AveC на *S. avermitilis*, представена на ФИГУРА 1 (SEQ ID NO:1) или изроден неин вариант, но която по-нататък включва една или повече мутации, които кодират заместването на един аминокиселинен остатък с различен аминокиселинен остатък в избрана позиция от продукта на AveC гена. В някои неограничени варианти, които са дадени по-долу в примерите, такива субституции могат да бъдат въведени във всяка една от

аминокиселинните позиции от продукта на AveC гена, които съответстват на аминокиселинните позиции 38, 48, 55, 89, 99, 111, 136, 138, 139, 154, 179, 228, 230, 238, 266, 275, 289 или 298 от SEQ ID NO:2 или някои техни комбинации.

Мутации в AveC кодиращата последователност се въвеждат, чрез всеки от разнообразните известни методи, включващи "error-prone" PCR или чрез сериен мутагенезис. Например, олигонуклеотид-насоченият мутагенезис може да бъде направен, за да промени последователността на aveC алела или на ORF по точно определен начин, като например чрез въвеждане на едно или повече рестриктазни места, или на стоп кодон в специфични райони на aveC алела или на ORF. Методи като тези описани в U.S. Патент 5.605.793. U.S. Патент 5,830,721 и U.S. Патент 5,837,458, които включват случайно фрагментиране, повторение на циклите на мутагенезис и нуклеотидно изрязване, може също да бъдат използвани за да се създадат големи библиотеки от полинуклеотиди, които имат нуклеотидни последователности, кодиращи aveC мутации.

Насочените мутации, могат да бъдат използвани по-специално там където служат за да променят един или повече консервативни аминокиселинни остатъци на продукта на AveC гена. Например, сравнението на производните аминокиселинни последователности на AveC генните продукти и на продуктите на хомолозите на AveC гена на *S. avermitilis* (SEQ ID NO:2), *S. griseochromogenes* (SEQ ID NO:5) и *S. hygroscopicus* (SEQ ID NO:4), представени на ФИГУРА 6, която показва местата с висока консервативност на аминокиселинните остатъци между тези три вида. Насочен мутагенезис, който води до промяна в един или повече от тези консервативни аминокиселинни остатъци, може да бъде специфично

ефективен за създаването на нови мутантни щамове, които показват желани промени в авермектиновата продукция.

Случаен мутагенезис може също да бъде използван и може да бъде направен чрез излагане на клетки на *S. avermitilis* на ултравиолетова радиация или рентгеново лъчение или на действието на химични мутагени, като N-метил-N'-нитрозогуанидин, етил метан сулфонат, азотна киселина или азотен иперит. Виж например Ausubel, 1989, по-горе, за преглед на техниките на мутагенезис.

Един път създадени мутиралите полинуклеотидни молекули, те се скринират за да се потвърди дали могат да модулират биосинтезата на авермектините в *S. avermitilis*. В предпочитан вариант, една полинуклеотидна молекула, която има мутирала нуклеотидна последователност се въвежда в клетки на *S. avermitilis* щам, в които aveC гена е инактивиран за да се провери, чрез допълване aveC негативния (aveC⁻) фон. В не ограничаващ метод, мутиралата полинуклеотидна молекула е въведена за сплайсинг в експресионен плазмид, в оперативна връзка с един или повече регулаторни елементи, който плазмид за предпочитане също включва един или повече гени за резистентност, които да разрешат селекцията на трансформираните клетки. Този вектор след това е трансформиран в aveC клетки-гостоприемници, чрез използване на известни техники, и трансформираните клетки се избират и култивират в подходящи среди за ферментация, при условия, които позволяват да се индуцира продукцията на авермектини. Продуктите на ферментацията след това се анализират с HPLC за да се определи способността на мутиралите полинуклеотидни молекули да допълват клетките-гостоприемници. Някои вектори, носещи мутирали полинуклеотидни молекули, способни да редуцират съотношението B2:B1 на авермектините, включително

pSE188, pSE199, pSE231, pSE239, pSE290 чрез pSE297 са дадени в примерите описани в Глава 8.3 по-долу.

Настоящото изобретение осигурява методи за идентифициране на мутации в ORF на aveC на *S. avermitilis*, способни да променят съотношението и/или количеството на получените авермектини. В предпочитан вариант, настоящето изобретение осигурява метод за идентифициране на мутации в ORF на aveC, водещи до промяна в съотношението клас 2:1 на получените авермектини, включващ: (а) определяне на съотношението клас 2:1 на получените авермектини от клетки на *S. avermitilis* щам, в които техният нативен aveC алел е инактивиран и в които полинуклеотидната молекула, включваща нуклеотидна последователност, кодираща мутантен AveC генен продукт е въведена и експресирана; (б) определяне на съотношението клас 2:1 на получените авермектини от клетки на *S. avermitilis* щам, от стъпка (а), но който вместо това експресиращ само дивия тип aveC алел или aveC алел, който има нуклеотидна последователност на ORF от ФИГУРА 1 (SEQ ID NO:1) или нейна хомоложна нуклеотидна последователност; и (в) сравнение на съотношението клас 2:1 на авермектините, получени от клетките на *S. avermitilis* от стъпка (а) със съотношението клас 2:1 на авермектините, получени от клетките на *S. avermitilis* от стъпка (б); като когато съотношението на клас 2:1 авермектините, получени от клетките на *S. avermitilis* от стъпка (а) е различно от съотношението клас 2:1 на авермектините, получени от клетките на *S. avermitilis* от стъпка (б), тогава е идентифицирана мутацията в ORF на aveC способна да промени съотношението клас 2:1 на авермектините. В предпочитан вариант, съотношението на авермектините клас 2:1 се редуцира от мутацията.

По-нататък в предпочитан вариант, настоящето изобретение осигурява метод за идентифициране на мутация в ORF на *aveC* или в генетични конструкции, включващи ORF на *aveC*, способни да променят количеството на получените авермектини, включващ (а) определяне на количеството на авермектините, получени от клетки на *S. avermitilis*, в които техният нативен *aveC* алел е инактивиран и в които полинуклеотидна молекула, включваща нуклеотидна последователност, кодираща мутантен продукт на *AveC* гена или включваща генетичен конструкт, включващ нуклеотидна последователност, кодираща мутантен *AveC* генен продукт е въведена и експресирана; (б) определяне на количеството на авермектините, получени от клетките на същия щам *S. avermitilis* от стъпка (а) но който вместо това експресиращ само дивия тип *aveC* алел или негова хомоложна нуклеотидна последователност; и (в) сравняване на количеството на авермектините, получени от щама на *S. avermitilis* от стъпка (а) и количеството на авермектините, получени от щама от стъпка (б); като ако количеството на авермектините, получени от щама на *S. avermitilis* от стъпка (а) е различно от количеството на авермектините, получени от щама от стъпка (б), тогава е идентифицирана мутация в ORF на *aveC* или в генетичния конструкт, способна да променя количеството на авермектините. В предпочитан вариант, количеството на получените авермектини се повишава от мутацията.

Всеки от гореспоменатите методи за идентифициране на мутации се изпълнява, чрез използване на културална среда за ферментация, за предпочитане допълнена с циклохексан карбоксилна киселина, въпреки че други подходящи мастно киселинни прекурсори, като прекурсорите на всяка от мастните киселини посочени в ТАБЛИЦА 1, могат също да бъдат използвани.

Веднъж като е идентифицирана мутиралата полинуклеотидна молекула, която модулира продукцията на авермектини в желаната посока, може да бъде определено мястото на мутацията в нуклеотидната последователност. Например, полинуклеотидна молекула, която има нуклеотидна последователност, кодираща мутантен AveC генен продукт, може да бъде изолирана чрез PCR и анализирана чрез ДНК секвениране, чрез изплзване на известни методи. Чрез сравняване на ДНК последователността на мутирания aveC алел и тази на дивия тип aveC алел, мутацията (мутациите) отговорни за промяна в продукцията на авермектините може да бъде определена. В специфични, но неограничаващи варианти на настоящето изобретение, AveC генният продукт на *S. avermitilis*, включващ еднично аминокиселинно заместване във всеки един от остатъците 55(S55F), 138(S138T), 139(A139T) или 230(G230D), или двойно заместване в позициите 138(S138T) и 139(A139T или A139F), водещо до промени във функцията на AveC генния продукт, като промяна в съотношението на получените авермектини клас 2:1 (виж Глава 8, по-долу), където посочените аминокиселинни позиции, отговарят на тези, представени на ФИГУРА 1 (SEQ ID NO:2). В допълнение, за следващите седем комбинации от мутации (1) D48E/A89T; (2) S138T/A139T/G179S; (3) Q38P/L136P/E238D; (4) F99S/S138T/A139T/G179S; (5) A139T/M228T; (6) G111V/P289L; (7) A139T/K154E/ Q298H е показано че ефективно редуцират съотношението на авермектините клас 2:1. Както се използва тук, споменатите означения, като A139T, показват оригиналния аминокиселинен остатък с еднобуквено означение, който в този пример е аланин (A), в посочената позиция, която в този пример е 139 от полипептида (SEQ ID NO:2), следвана от аминокиселинния остатък, който замества оригиналния аминокиселинен остатък, който в този пример е треонин (T). Съответно,

полинуклеотидни молекули, които имат нуклеотидни последователности, кодиращи мутантния AveC генен продукт на *S. avermitilis*, включват също аминокиселинни замествания или делеции в една или повече от аминокиселинните позиции 38, 48, 55, 89, 99, 111, 136, 138, 139, 154, 179, 228, 230, 238, 266, 275, 289 или 298 (виж ФИГУРА 1) или всички техни комбинации, които са в обхвата на настоящето изобретение.

В предпочитан вариант, такива мутации кодират аминокиселинни замествания в една или повече от групите включващи:

- (а) аминокиселинен остатък Q в позиция 38, заместен от Р или от аминокиселина, която е консервативен заместител на Р;
- (б) аминокиселинен остатък D в позиция 48, заместен от Е или от аминокиселина, която е консервативен заместител на Е;
- (в) аминокиселинен остатък А в позиция 89, заместен от Т или от аминокиселина, която е консервативен заместител на Т;
- (г) аминокиселинен остатък F в позиция 99, заместен от S или от аминокиселина, която е консервативен заместител на S;
- (д) аминокиселинен остатък G в позиция 111, заместен от V или от аминокиселина, която е консервативен заместител на V;
- (е) аминокиселинен остатък L в позиция 136, заместен от Р или от аминокиселина, която е консервативен заместител на Р;
- (ж) аминокиселинен остатък S в позиция 138, заместен от Т или от аминокиселина, която е консервативен заместител на Т;
- (з) аминокиселинен остатък А в позиция 139, заместен от Т или F или от аминокиселина, която е консервативен заместител на Т или F;
- (и) аминокиселинен остатък K в позиция 154, заместен от Е или от аминокиселина, която е консервативен заместител на Е;
- (к) аминокиселинен остатък G в позиция 179, заместен от S или от аминокиселина, която е консервативен заместител на S;

(л) аминокиселинен остатък М в позиция 228, заместен от Т или от аминокиселина, която е консервативен заместител на Т;

(м) аминокиселинен остатък Е в позиция 238, заместен от D или от аминокиселина, която е консервативен заместител на D;

(н) аминокиселинен остатък Р в позиция 289, заместен от L или от аминокиселина, която е консервативен заместител на L;

(о) аминокиселинен остатък Q в позиция 298, заместен от H или от аминокиселина, която е консервативен заместител на H;

където консервативните аминокиселинни замествания са описани в Глава 5.1.

По-нататък, в предпочитан вариант, такива мутации, кодират комбинации от аминокиселинни замествания, където, комбинациите от заместените аминокиселинни остатъци са избрани от групата, състояща се от:

- (а) аминокиселинни остатъци S138 и A139;
- (б) аминокиселинни остатъци D48 и A89;
- (в) аминокиселинни остатъци S138, A139 и G179;
- (г) аминокиселинни остатъци Q38, L136 и E238;
- (д) аминокиселинни остатъци F99, S138, A139 и G179;
- (е) аминокиселинни остатъци A139 и M228;
- (ж) аминокиселинни остатъци G111 и P289; и
- (з) аминокиселинни остатъци A139, K154 и Q298.

По-нататък в предпочитан вариант, специфични комбинации от мутации в aveC алела, които се използват за ефективно намаляване на съотношението на авермектините клас 2:1, в съответствие с настоящето изобретение са избрани от една или повече, от групата на:

- (а) S138T/A139T;

- (б) S138T/A139F;
- (в) D48E/A89T;
- (г) S138T/A139T/G179S;
- (д) Q38P/L136P/E238D;
- (е) F99S/S138T/A139T/G179S;
- (ж) A139T/M228T;
- (з) G111V/P289L; и
- (и) A139T/K154E/Q298H.

Настоящото изобретение по-нататък осигурява конструкти за създаване на нови щамове *S. avermitilis*, клетките на които съдържат мутирал *aveC* алел, който води до променена продукция на авермектини. Например, настоящето изобретение осигурява, рекомбинантни вектори, които могат да бъдат използвани за насочване на която и да е от полинуклеотидните молекули, включващи мутирани нуклеотидни последователности на настоящето изобретение, към мястото на *aveC* гена от хромозомата на *S. avermitilis* за да се вкара на мястото на ORF на *aveC* или на част от него, чрез хомоложна рекомбинация. Съгласно настоящето изобретение, обаче, полинуклеотидна молекула, включваща мутирала нуклеотидна последователност от настоящето изобретение, заедно с тази осигурена тук може да функционира, като модулира биосинтезата на авермектини, когато е вкарана в хромозомата на *S. avermitilis*, на място различно от *aveC* гена или на друго място, или когато се поддържа епизомално в клетките на *S. avermitilis*. Така, настоящето изобретение, също осигурява вектори, включващи полинуклеотидна молекула, включваща мутирала нуклеотидна последователност от настоящето изобретение, които вектори могат да бъдат използвани за да вкарат полинуклеотидната

молекула в хромозомата на *S. avermitilis* на мястото на *aveC* гена или на друго място, или да бъдат поддържани епизомално.

В предпочитан вариант, настоящето изобретение осигурява вектори за заместване на гени, които могат да бъдат използвани да въведат мутирал *aveC* алел или изроден негов вариант в клетки на *S. avermitilis* щам и по този начин да се създаде нов *S. avermitilis* щам, клетките на който продуцират авермектини с променено съотношение клас 2:1, в сравнение с клетките на същия щам, които вместо това експресират само дивия тип *aveC* алел. В предпочитан вариант, съотношението клас 2:1 на получените от тези клетки авермектини, е редуцирано. Такива вектори, за заместване на гени могат да бъдат конструирани, чрез използване на мутирали полинуклеотидни молекули, присъстващи в експресионни вектори, осигурени тук, като например pSE188, pSE199 и pSE231, които експресионни вектори са описани в примерите в Глава 8 по-долу.

По-нататък в предпочитан вариант, настоящето изобретение осигурява вектори, които могат да бъдат използвани за вкарване на мутирал *aveC* алел или изроден негов вариант, в клетки на *S. avermitilis* щам, за да се създадат нови щамове, в клетките на които получените авермектини са с променено количество, в сравнение с клетки от същия щам, които вместо това експресират само дивия тип *aveC* алел. В предпочитан вариант, количеството на авермектините, получени от клетките се повишава. В специфичен, но не ограничен вариант, такъв вектор по-нататък включва силен промотор, който е известен в областта като например, силния конститутивен *epm* промотор от *Saccharopolyspora erythraea*, който е разположен преди *aveC* алела и е в оперативна връзка с него. Такъв вектор може да бъде плазмид pSE189, описан в Пример 11 по-долу или може да бъде конструиран, чрез използване на мутирал *aveC* алел на плазмид pSE189.

05.03.02

По-нататък в предпочитан вариант настоящето изобретение осигурява вектори за заместване на гени, които се използват да инактивират *aveC* гена на дивия тип *S. avermitilis* щам. В не ограничаващ вариант, такива вектори за заместване на гени могат да бъдат конструирани, чрез използване на мутирани полинуклеотидни молекули, присъстващи в плазмид pSE180 (ATCC209605), който е даден в примерите в Глава 8.1 по-долу (ФИГУРА 3). Настоящото изобретение, по-нататък осигурява вектори за заместване на гени, които включват полинуклеотидна молекула, включваща или състояща се от нуклеотидни последователности, за които чрез *in situ* хибридизация е показано, че естествено се припокриват с нуклеотидните последователности, на *aveC* гена, включващи тези нуклеотидни последователности, показани на ФИГУРА 1 (SEQ ID NO:1), които вектори могат да бъдат използвани за да се елиминира ORF на *aveC* на *S. avermitilis*.

Настоящото изобретение по-нататък осигурява методи за създаване на нови щамове *S. avermitilis*, включващи клетки, които експресират мутирал *aveC* алел и които водят до получаването на авермектини с променено съотношение и/или в променено количество, в сравнение с клетки на същия щам *S. avermitilis*, които вместо това експресират само дивия тип *aveC* алел. В предпочитан вариант, настоящето изобретение осигурява метод за създаването на нови щамове *S. avermitilis* включващи клетки, които експресират мутирал *aveC* алел и които водят до получаването на авермектини в променено съотношение клас 2:1, в сравнение с клетки на същия щам *S. avermitilis*, които вместо това експресират само дивия тип *aveC* алел, включващ трансформация на клетки на *S. avermitilis* щам с вектор, който носи мутирал *aveC* алел, който кодира генни продукти, които променят съотношението клас 2:1 на авермектините, получени от клетките на щам

S. avermitilis, експресиращи техен мутирал *aveC* алел, в сравнение с клетки от щам *S. avermitilis*, които вместо това експресират само дивия тип *aveC* алел, и селекция на трансформираните клетки, които водят до получаването на авермектини с променено съотношение клас 2:1, в сравнение със съотношението на авермектините клас 2:1, получени от клетки на същия щам, но които вместо това експресират само дивия тип *aveC* алел. В още по-предпочитан вариант, настоящето изобретение осигурява метод за създаване на нов щам *S. avermitilis*, включващ трансформация на клетки от щам *S. avermitilis* с вектор, способен да въведе мутация в *aveC* алела на тези клетки, където мутацията в *aveC* алела води до заместване в *AveC* генния продукт на различни аминокиселинни остатъци в една или повече от аминокиселинните позиции, отговарящи на аминокиселинните остатъци 38, 48, 55, 89, 99, 111, 136, 138, 139, 154, 179, 228, 230, 238, 266, 275, 289 или 298 от SEQ ID NO:2, такива че клетките на *S. avermitilis* щама, в който *aveC* алела е мутирал и води до получаването на авермектини в съотношение клас 2:1, което е различно от съотношението на авермектините, получени от клетки на същия щам *S. avermitilis*, който вместо това експресира само дивия тип *aveC* алел. В предпочитан вариант, промененото съотношение клас 2:1 на авермектините е редуцирано.

Както се използва тук, аминокиселинен остатък, кодиран от *aveC* алел в хромозомата на *S. avermitilis* или от вектор или от изолирана полинуклеотидна молекула от настоящето изобретение, той се отнася до "съответстващ на" специфичен аминокиселинен остатък от SEQ ID NO:2 или където аминокиселинно заместване се отнася до появило се в специфична позиция "съответстваща на" специфичен аминокиселинен остатък от SEQ ID NO:2, с цел да бъде отнесен до аминокиселинен остатък от съответстващата локализация в *AveC* генния продукт, която може да бъде бързо определена от специалистите в областта, чрез

отнасяне към аминокиселинната секвенция, представена тук, като SEQ ID NO:2.

Настоящото изобретение по-нататък осигурява методи за създаване на нови щамове, където специфични мутации в *aveC* алела, кодиращ определени мутантни форми са цитирани като основни промени в специфични нуклеотидни позиции в *aveC* алела, "съответстващи на" специфични нуклеотидни позиции, показани в SEQ ID NO:1. Както по-горе, отнесени към съответстващи аминокиселинни позиции, където нуклеотидните позиции в *aveC* алела се отнасят като "съответстващи на" специфични нуклеотидни позиции от SEQ ID NO:1, с цел да се отнесат до нуклеотидите в съответстващите места от *aveC* нуклеотидната последователност, които могат бързо да бъдат определени от специалистите в областта, чрез отнасяния до нуклеотидни последователности, представени тук като SEQ ID NO:1.

По-нататък в предпочитан вариант, настоящето изобретение осигурява метод за създаване на нови щамове *S. avermitilis*, включващи клетки, които продуцират авермектини с променено количество, включващ трансформация на клетки от *S. avermitilis* щам с вектор, който носи мутирал *aveC* алел, или с генетичен конструкт, включващ *aveC* алела, експресията на който води до промяна в количеството на получените авермектини от клетките на *S. avermitilis* щам, експресиращи мутирал *aveC* алел или генетичен конструкт, в сравнение с клетките на същия щам, които вместо това експресират само единичния див тип *aveC* алел, и селекция на трансформираните клетки, които водят до получаването на авермектини с променено количество, в сравнение с количеството на авермектините, получени от клетки на щам, който вместо това експресира само единичен див тип *aveC* алел. В предпочитан вариант, количеството на авермектините, получени в трансформираните клетки е повишено.

По-нататък в предпочитан вариант, настоящето изобретение осигурява метод за създаване на нови щамове *S. avermitilis*, клетките на които включват инактивиран aveC алел, включващ трансформация на клетки на *S. avermitilis* щам, които експресират всеки aveC алел, с вектор който инактивира aveC алела, и селекция на трансформирани клетки в които aveC алела е подтиснат. В предпочитан, но неограничаващ вариант, клетките на *S. avermitilis* щам са трансформирани с вектор за заместване на гени, който носи aveC алел, който е инактивиран от мутация или от заместване на част от aveC алела с хетероложна генна последователност и селекция на трансформантите, при които в други случаи нативния aveC алел е заместен с инактивиран aveC алел. Инактивацията на aveC алела, може да бъде определена, чрез HPLC анализ на продуктите на ферментацията, както е описано по-долу. В специфичен, но не и ограничаващ вариант, описан в Глава 8.1 по-долу, aveC алелът е инактивиран чрез въвеждане на ermE ген от *Saccharopolyspora erythraea* в ORF на aveC.

Настоящото изобретение по-нататък осигурява нови щамове *S. avermitilis*, включващи клетки, трансформирани с която и да е от полинуклеотидните молекули или вектори от настоящето изобретение. В предпочитан вариант, настоящето изобретение осигурява нови щамове на *S. avermitilis*, включващи клетки, които експресират мутирал aveC алел или изроден негов вариант на мястото на, или в допълнение на дивия тип aveC алел, където клетките на новия щам водят до получаването на авермектини със променено съотношение клас 2:1, в сравнение със съотношението клас 2:1 на авермектините, получени от клетки на същия щам, който вместо това експресира само дивия тип aveC алел. В предпочитан вариант, промененото съотношение клас 2:1 на получените от новите клетки авермектини е редуцирано. Такива нови щамове се използват за продукция в широки мащаби, на авермектини с

търговско значение, като дорамектин. В още по-предпочитан вариант, настоящето изобретение осигурява клетки на *S. avermitilis*, включващи която и да е от гореспоменатите мутации или комбинации от мутации в aveC алела в нуклеотидни позиции, съответстващи на тези, представени тук по-горе или които в други случаи кодират което и да е от гореспоменатите аминокиселинни замествания в AveC генния продукт. Въпреки че такива мутации могат да присъстват в такива клетки в извън хромозомални елементи, като плазмид, за предпочитане е такива мутации да присъстват в aveC алел, локализиран в хромозомата на *S. avermitilis*. В предпочитан вариант, настоящето изобретение осигурява щам на *Streptomyces avermitilis*, включващ клетки, които имат мутация в aveC алела, кодиращ Ave C генния продукт, които имат замествания в една или повече аминокиселинни позиции, съответстващи на аминокиселинните остатъци 38, 48, 55, 89, 99, 111, 136, 138, 139, 154, 179, 228, 230, 238, 266, 275, 289 или 298 от SEQ ID NO:2, където клетките водят до получаването на авермектини в съотношение клас 2:1, което е различно от съотношението на авермектините, получени от клетките на същия щам *S. avermitilis*, които експресират само дивия тип aveC алел.

Първата задача на скрининг анализите описани тук е да се идентифицират мутиралите алели на aveC гена, експресията на които в *S. avermitilis* клетки променя и още по-специално редуцира съотношението клас 2:1 на получените авермектини. В предпочитан вариант, съотношението на авермектините B2:B1, получени от клетките на нов *S. avermitilis* щам от настоящето изобретение, експресиращи мутирал aveC алел или изроден негов вариант от настоящето изобретение е около 1.6:1 или по-малко. В още по-предпочитан вариант, съотношението е около 1:1 или по-малко. В още по-предпочитан вариант, съотношението е около 0.84:1 или по-малко. В още по-

предпочитан вариант, съотношението е около 0.80:1 или по-малко. В още по-предпочитан вариант, съотношението е около 0.75:1 или по-малко. В още по-предпочитан вариант, съотношението е около 0.73:1 или по-малко. В още по-предпочитан вариант, съотношението е около 0.68:1 или по-малко. И даже в още по-предпочитан вариант, съотношението е около 0.67:1 или по-малко. В още по-предпочитан вариант, съотношението е около 0.57:1 или по-малко. И даже в още по-предпочитан вариант, съотношението е около 0.53:1 или по-малко. Даже в още по-предпочитан вариант, съотношението е около 0.42:1 или по-малко. Даже в още по-предпочитан вариант, съотношението е около 0.40:1 или по-малко.

В специфичен вариант, описан по-долу, новите клетки от настоящето изобретение продуцират авермектините циклохексил В2:циклохексил В1 в съотношение по-малко от 1.6:1. В различен специфичен вариант, описан по-долу, новите клетки от настоящето изобретение продуцират авермектините циклохексил В2:циклохексил В1 в съотношение около 0.94:1. По-нататък в друг специфичен вариант, описан по-долу, новите клетки от настоящето изобретение продуцират авермектините циклохексил В2:циклохексил В1 в съотношение около 0.88:1. По-нататък в друг специфичен вариант, описан по-долу, новите клетки от настоящето изобретение продуцират авермектините циклохексил В2:циклохексил В1 в съотношение около 0.84:1. Също по-нататък в друг специфичен вариант, описан по-долу, новите клетки от настоящето изобретение продуцират авермектините циклохексил В2:циклохексил В1 в съотношение около 0.75:1. Също по-нататък в друг специфичен вариант, описан по-долу, новите клетки от настоящето изобретение продуцират авермектините циклохексил В2:циклохексил В1 в съотношение около 0.73:1. Също по-нататък в друг специфичен вариант, описан по-долу, новите клетки от настоящето изобретение

продуцират авермектините циклохексил В2:циклохексил В1 в съотношение около 0.68:1. Също по-нататък в друг специфичен вариант, описан по-долу, новите клетки от настоящето изобретение продуцират авермектините циклохексил В2:циклохексил В1 в съотношение около 0.67:1. Също по-нататък в друг специфичен вариант, описан по-долу, новите клетки от настоящето изобретение продуцират авермектините циклохексил В2:циклохексил В1 в съотношение около 0.57:1. Също по-нататък в друг специфичен вариант, описан по-долу, новите клетки от настоящето изобретение продуцират авермектините циклохексил В2:циклохексил В1 в съотношение около 0.53:1. Също по-нататък в друг специфичен вариант, описан по-долу, новите клетки от настоящето изобретение продуцират авермектините циклохексил В2:циклохексил В1 в съотношение около 0.42:1. И още по-нататък в друг специфичен вариант, описан по-долу, новите клетки от настоящето изобретение продуцират авермектините циклохексил В2:циклохексил В1 в съотношение около 0.40:1.

По-нататък в предпочитан вариант, настоящето изобретение осигурява нови щамове на *S. avermitilis*, включващи клетки, които експресират мутирал aveC алел или изроден негов вариант, или генетичен конструктор включващ aveC алел или изроден негов вариант, на мястото на или в допълнение на дивия тип aveC алел, където клетките от новия щам продуцират авермектини в променено количество, в сравнение с клетките от същия щам, които вместо това експресират само дивия тип aveC алел. В предпочитан вариант, новия щам продуцира повишено количество от авермектини. В неограничаващ вариант, генетичния конструктор по-нататък включва силен промотор, като силния конститутивния ermE промотор от *Saccharopolyspora*

erythraea, който е разположен след ORF на *aveC* и е в оперативна асоциация с него.

По-нататък в предпочитан вариант, настоящето изобретение осигурява нови щамове на *S. avermitilis*, включващи клетки в които *aveC* гена е инактивиран. Такива щамове се използват за определяне на разликите в спектъра на авермектините, които те продуцират в сравнение с дивия тип шам, и за допълване на скрининг анализа, както е описано тук, за определяне дали насочения или случаен мутагенезис на *aveC* гена се отразява върху авермектиновата продукция. В специфичен вариант описан по-долу, клетките-гостоприемници на *S. avermitilis* са генетично конструирани да съдържат инактивиран *aveC* ген. Например създаден е шам SE180-11, описан в примерите по-долу, чрез използване на плазмид за заместване на гени pSE180 (ATCC209605) (ФИГУРА 3), който е конструиран да инактивира *aveC* гена на *S. avermitilis*, чрез въвеждане на ген за резистентност *ermE* в кодиращата област на *aveC*.

Настоящото изобретение по-нататък осигурява рекомбинантно експресирани мутантни AveC генни продукти на *S. avermitilis*, кодирани от която и да е от гореспоменатите полинуклеотидни молекули от настоящето изобретение и методи за изготвяне на препарати от тях.

Настоящото изобретение по-нататък осигурява метод за продукция на авермектини, включващ култивиране на клетки от *S. avermitilis* шам, които клетки експресират мутирал *aveC* алел, който кодира генен продукт, който променя съотношението клас 2:1 на авермектините, получени в средата на култивираните клетки на *S. avermitilis* шам, експресиращи мутирал *aveC* алел, в сравнение с клетки на същия шам, които вместо това експресират само дивия тип *aveC* алел, при условия които позволяват или индуцират продукцията на авермектини в нея и получаване на тези авермектини от културата. В

предпочитан вариант, съотношението на авермектините клас 2:1, получени от културата от клетки експресиращи мутирал aveC алел се редуцира. Този метод, осигурява повишена ефикасност в продукцията на авермектини с търговско значение, като дорамектина.

Настоящото изобретение по-нататък осигурява метод за продукция на авермектини, включващ култивиране на клетки на *S. avermitilis* щам, които клетки експресират мутирал aveC алел или генетичен конструкт, включващ aveC алела, който води до продукцията на променено количество на авермектини, получени в средата за култивираните клетки на *S. avermitilis* щам, експресиращи мутирал aveC алел или генетичен конструкт, в сравнение с клетки от същия щам, които не експресират мутирал aveC алел или генетичен конструкт, но вместо това експресират само дивия тип aveC алел, при условия, които позволяват или индуцират продукцията на авермектини в средата, и повторното получаване на тези авермектини от културата. В предпочитан вариант, количеството на получените авермектини в културата от клетките, експресиращи мутирания aveC алел, изроден негов вариант или генетичен конструкт е повишено.

Настоящото изобретение по-нататък осигурява нови авермектинови състави, получени от *S. avermitilis* щам, експресиращ мутирал aveC алел или изроден негов вариант, който кодира генен продукт, който редуцира съотношението клас 2:1 на авермектините, получени от клетките на *S. avermitilis* щам, експресиращ мутирал aveC алел или изроден негов вариант, в сравнение с клетки от същия щам, който вместо това експресиращ само дивия тип aveC алел, където новия авермектинов състав се получава в редуцирано съотношение клас 2:1, в сравнение със съотношението клас 2:1 на авермектините, получен от клетки на същия щам *S. avermitilis*, който вместо това експресиращ само дивия тип aveC алел. Новият авермектинов състав, може да присъства

като продукт на ферментацията, в бедната на хранителни вещества среда, или може да бъде изолиран от нея. Новият авермектинов състав може да бъде частично или значително пречистен от културалната течност, чрез известни биохимични техники за пречистване, като преципитация с амониев сулфат, диализа, фракциониране на базата на молекулни размери, йонообменна хроматография, HPLC и т.н.

5.4. ПРИЛОЖЕНИЕ НА АВЕРМЕКТИНИТЕ

Авермектините са високо активни антипаразитни агенти, които се използват специфично като противоглистни агенти, като агенти срещу ектопаразити, инсектицити и агенти срещу акари. Авермектинови съединения, получени съгласно методите от настоящето изобретение, се използват за всяка една то тези цели. Например, авермектинови съединения, получени съгласно настоящето изобретение се използват при лечението на различни заболявания или състояния при хората, по-специално, когато тези заболявания или състояния са причинени от паразитни инфекции, известни в областта. Виж например Ikeda и Omura, 1997. Chem. Rev. 97(7):2591-2609. По-специално авермектинови съединения получени съгласно настоящето изобретение са ефективни при лечение на различни заболявания или състояния, причинени от ендопаразити, каквито са нематодните паразити, които могат да инфектират хората, домашните животни, свинете, овцете, домашните птици, конете или говедата.

По-специално, авермектинови съединения, получени съгласно настоящето изобретение са ефективни срещу нематоди, които инфектират хората, както и тези които инфектират различни видове животни. Такива нематоди включват гастроинтестинални паразити, като *Ancylostoma*, *Necator*, *Ascaris*, *Strongyloides*, *Trichinella*, *Capillaria*,

Trichuris, *Enterobius*, *Dirofilaria* и паразити, които се намират в кръвта или други тъкани или органи, като глистите и извънчревните форми на *Strongyloides u Trichinella*.

Авермектиновите съединения, получени съгласно настоящето изобретение също се използват за лечение на ектопаразитни инфекции, включващи например зарази на бозайници и птици с артроподи, зарази причинени от кърлежи, дребни червеи, въшки, бълхи, мухи-месарки, жилещи насекоми или ларви на мигриращи двукрили, които измежду другите могат да засегнат говедата и конете.

Авермектиновите съединения, получени съгласно настоящето изобретение, също се използват като инсектициди срещу "домакински" насекоми, като например хлебарки, молци по дрехите и килимите и други, както и срещу насекоми по храни от зърнени растения, които насекоми включват паяци, червен, листни въшки, гъсеници и сред другите и правокрили насекоми, като скакалци.

Животните, които могат да бъдат лекувани с авермектинови съединения, получени съгласно настоящето изобретение, включват овце, говеда, коне, сърни, кози, свине, птици, включително и домашни птици, и кучета и котки.

Авермектиново съединение, получено съгласно настоящето изобретение се въвежда като препарат, подходящ за предвиденото специфично използване, в зависимост от спецификата на вида на животното-гостоприемник, което е лекувано и паразита или насекомото - причинител на заразата. Като агент срещу паразит, авермектиновото съединение, получено съгласно настоящето изобретение може да бъде въведен орално под формата на капсула, болус, таблетка или като течна съставка или също така може да бъде въведено под формата на течност, или чрез инжекция или като имплант. Такива препарати се приготвят по общоприет начин в съответствие със стандартите на ветеринарната

практика. Така капсулите, болусите или таблетите могат да бъдат приготвени чрез смесване на активни компоненти с подходящ добре разделящ дилуент или носител допълнително съдържащ дезинтегриращ и/или свързващ агент, като нишесте, лактоза, талк, магнезиев стерат и т.н. Течните състави, могат да бъдат приготвени, чрез дисперсия на активните компоненти във воден разтвор, заедно със диспергиращия или втечняващ агент и т.н. Съставите за инжектиране могат да бъдат приготвени под формата на стерилни разтвори, които могат да съдържат други субстанции, като например съществени соли и/или глюкоза, които правят разтвора изотоничен на кръвта.

Такива състави ще варират в зависимост от теглото на активното съединение, в зависимост от лекувания пациент или вида на лекуваното животно-гостоприемник, от остротата и типа на инфекцията, и от телесното тегло на гостоприемника. Обикновено за орално приложение ще бъде задоволителна доза от активно съединение от около 0.001 до 10 mg на kg от теглото на пациент или от теглото на животното, дадени като единична доза или разделни дози за период от 1 до 5 дни. Може да има случаи обаче, където са посочени по-високи или по-ниски вариации в дозировките, определени например от лекар или ветеринар, на базата на клинични симптоми.

Като алтернатива, авермектиновото съединение получено съгласно настоящето изобретение, може да бъде въведен в комбинация с храни за животни и за тази цел, концентрирана хранителна добавка или смес може да се приготви за смесване с нормалната храна на животните.

За използване като инсектицид в борбата срещу насекоми по зърнените култури, авермектиновото съединение, получено съгласно настоящето изобретение, може да бъде приложена под формата на

спрей, на прах или като емулсия и според изискванията, и в съгласие със стандартите на селскостопанската практика.

6. ПРИМЕР ЗА ИЗПЪЛНЕНИЕ НА ИЗОБРЕТЕНИЕТО:
ФЕРМЕНТАЦИЯ ПРИ *STREPTOMYCES AVERMITILIS* И АНАЛИЗ НА
АВЕРМЕКТИНИТЕ B2:B1

Щамове при които липсва киселата дехидрогеназна активност за 2-оксо разклонената верига и 5-О-метилтрансферазната активност не водят до получаването на авермектини, ако средата за ферментация не е допълнена с мастни киселини. Този пример демонстрира, че в такива мутанти могат да бъдат получени авермектини с големи вариации в съотношението B2:B1, когато биосинтезата е иницирирана в присъствие на различни мастни киселини.

6.1. МАТЕРИАЛИ И МЕТОДИ

Streptomyces avermitilis ATCC 53692 се съхранява при -70°C , в течна среда, включваща: Strach (Nadex, Laing National) - 20 g, Pharmamedia (Trader's Protein, Memphis, TN) - 15g; Ardamine pH (Yeast Products Inc) - 5g; Калциев карбонат - 1g. Крайния обем е нагласен до 1 литър с чешмяна вода, pH е нагласено до 7.2 и средата се автоклавира при 121°C за 25 минути.

Два милилитра от размразената суспензия, приготвянето на която е описано по-горе се инокулира в колба, съдържаща 50 ml от същата среда. След 48 часа инкубация на 28°C на ротационен клатач, при 180 rpm, 2 ml от течната среда се използва за инокулиране на колба, съдържаща 50 ml от среда за продукция, състояща се от: Strach (Nadex, Laing National) - 80 g, Калциев карбонат - 7g, Pharmamedia - 5g;

дикалиев хидроген фосфат - 1g, магнезиев сулфат - 1g, глутамова киселина - 0.6 g; железен сулфат хептахидрат - 0.01 g; цинков сулфат - 0.001 g; манганов сулфат - 0.001g. Крайния обем се нагласява до 1 литър с чешмяна вода, рН се нагласява до 7.2 и средата се автоклавира при 121 ° С за 25 минути.

Различни субстрати на карбоксилкови киселини (виж ТАБЛИЦА 1) се разтварят в метанол и се добавят към течната среда за ферментация 24 часа след инокулирането, като крайната им концентрация е 0.2 g/литър. Средата за ферментация се инкубира 14 дни на 28 ° С, след което средата се центрофугира (2500 rpm за 2 минути) и супернатантата се отстранява. Мицелната утайка се екстрахира с ацетон (15 ml), след което с дихлорометан (30 ml) и органичната фаза се разделя, филтрува се, след което се продухва докато се изсуши. Остатъка се взима в метанол (1ml) и се анализира с HPLC с Hewlett-Packard 1090A течен хроматограф, оборудван със диоден лъчев сканиращ детектор, настроен на 240 nm. Използваната колона е Beckman Ultrasphere C-18, 5 µm, 4.6 mm x 25 cm колона поддържана при 40 ° С. Двадесет и пет µl от горепосочения метанолов разтвор се инжектират в колоната. Елуирането става чрез линеен градиент на метанол-вода от 80:20 до 95:5 за повече от 40 минути със скорост 0.85ml/минута. Две стандартни концентрации на циклохексил В1 се използват за калибриране на детекторния отговор и се измерва площта под кюветите за В2 и В1 авермектините.

6.2. РЕЗУЛТАТИ

Времето на задържане при HPLC на В2 и В1 и съотношенията 2:1 са показани в ТАБЛИЦА 1.

ТАБЛИЦА 1

Субстрати	HPLC Време на задържане (минути)		Съотношение
	B2	B1	B2:B1
4-Тетрахидропиран карбоксилна киселина	8.1	14.5	0.25
Изомасленакиселина	10.8	18.9	0.5
3-Фуран-карбоксилна киселина	7.6	14.6	0.62
S-(+)-2-метилмаслена Киселина	12.8	21.6	1.0
Циклохексанкарбоксилна киселина	16.9	26.0	1.6
3-Тиофенкарбоксилна киселина	8.8	16.0	1.8
Циклопентанкарбоксилна Киселина	14.2	23.0	2.0
3-Трифлорометилмаслена киселина	10.9	18.8	3.9
2-Метилпентанова киселина	14.5	24.9	4.2
Циклохептанкарбоксилна киселина	18.6	29.0	15.0

Данните представени в ТАБЛИЦА 1 показват много широк обхват на вариациите в съотношенията B2:B1 на получените авермектини, показващи значителни различия в резултатите при

прехода на дехидратиране от клас 2 съединенията към клас 1 съединенията, в зависимост от природата на странична верига на първоначално приложената мастна киселина. Това показва, че промените в съотношението B2:B1, дължащи се на променения AveC протеин, могат да бъдат специфични за даден субстрат. Следователно скринингът на мутанти, показващи промени в съотношението B2:B1, получено за даден субстрат изисква той да бъде направен в присъствие на този субстрат. В последващите примери, описани по-долу се използва циклохексанакарбоксилна киселина, като субстрат за скрининг. Субстрата обаче се използва само като пример за потенциален субстрат и не цели да ограничи приложимостта в настоящето изобретение.

7. ПРИМЕР ЗА ИЗПЪЛНЕНИЕ НА ИЗОБРЕТЕНИЕТО:

ИЗОЛИРАНЕ НА aveC ГЕНА.

Този пример описва изолирането и характеризирането на район от хромозомата на *Streptomyces avermitilis*, който кодира AveC генния продукт. Както е показано по-долу, aveC гена е идентифициран като способен да модифицира съотношението циклохексил-B2 и циклохексил-B1 (B2:B1) на получените авермектини.

7.1. МАТЕРИАЛИ И МЕТОДИ

7.1.1. КУЛТИВИРАНЕ НА STREPTOMYCES ЗА ДНК ИЗОЛИРАНЕ

Следващите методи се използват за култивиране на *Streptomyces*. Единични колонии от *S. avermitilis* ATCC 31272 (изолирана единична колония #2) са изолирани върху 1/2 подсилена YPO-6 среда

включваща: Difco Yeast Extract - 5g; Difco Bacto-peptone - 5g; декстроза - 2.5g; MOPS - 5 g; Difco Bacto agar - 15 g. Крайния обем се нагласява до 1 литър с дестилирана вода, рН се нагласява до 7.0 и средата се автоклавира при 121 °C за 25 минути.

Получения мицел върху гореописаната среда се използва за инокулиране на 10 ml в TSB среда (Difco Tryptic Soy Broth - 30 g в 1 литър дестилирана вода, автоклавирана при 121 °C за 25 минути) в 25 mm x 150 mm епруветка, която се поддържа на клатач (300 грm) при 28 °C за 48 -72 часа.

7.1.2. ИЗОЛИРАНЕ НА ХРОМОЗОМНАТА ДНК НА *STREPTOMYCES*

Аликвоти (0.25 ml или 0.5 ml) от мицела, получен както е описано по-горе се поставят в 1.5 ml микроцентрифужни епруветки и клетките се концентрират чрез центрофугиране при 12,000 g за 60 секунди. Супернатантите се отстраняват и клетките се ресуспендират в 0.25 ml TSE буфер (20 ml 1.5M захароза, 2.5 ml 1M Трис-HCl, рН 8.0, 2.5 ml 1M ЕДТА рН 8.0 и 75 ml dH₂O), съдържащ 2 mg/ml лизозим. Пробите се инкубират на 37 °C за 20 минути, като се клатят, поставени в автоматичен апарат за изолиране на нуклеинови киселини AutoGen 540 [™] (Integrated Separation System, Natick, MA) и изолираната геномна ДНК, чрез използване на Цикъл 159 (нагласен чрез софтуеарно оборудване) съгласно инструкциите на производителя.

Освен това 5 ml от мицелите се поставят в 17 mm x 100 mm епруветка, клетките се концентрират чрез центрофугиране при 3,000 грm за 5 минути и супернатантите се отстраняват. Клетките се ресуспендират в 1 ml TSE буфер, концентрират се чрез центрофугиране на 3, 000 грm за 5 минути и супернатантите се отстраняват. Клетките се ресуспендират в 1 ml TSE буфер, съдържащ 2mg/ml лизозим и се

инкубират на 37°C на клатач, за 30-60 минути. След инкубацията се добавя 0.5 ml 10 % натриев додецил сулфат (SDS) и клетките се инкубират на 37°C докато не се лизират напълно. Лизатът се инкубира на 65°C за 10 минути, охлажда се до стайна температура, разделя се в две 1.5 ml Епендорф епруветки и се екстрахира 1х с 0.5 ml фенол/хлороформ (50 % фенол предварително еквилибриран с 0.5 M Трис, pH 8.0; 50 % хлороформ). Водната фаза се отстранява и се екстрахира от 2 до 5 х хлороформ:изоамилов алкохол (24:1). ДНК се преципитира чрез добавяне на 1/10 от обема 3M натриев ацетат, pH 4.8, сместта се инкубира на лед за 10 минути, центрофугира се сместта при 15, 000 rpm на 5°C за 10 минути и се отстранява супернатантата в чиста епруветка, в която е добавен 1 обем изопропанол. Супернатантата плюс изопропаноловата смес след това се инкубират на лед за 20 минути, центрофугират се на 15, 000 rpm за 20 минути при 5°C , супернатантата се отстранява и ДНК утайката се промива 1х със 70 % етанол. След като се изсуши утайката, ДНК се ресуспендира в TE буфер (10 mM Трис, 1 mM ЕДТА, pH 8.0).

7.1.3. ИЗОЛИРАНЕ НА ПЛАЗМИДНА ДНК ОТ *STREPTOMYCES*

Аликвоти (1.0 ml) от мицелите се поставят в 1.5 ml микроцентрофужни епруветки и клетките се концентрират чрез центрофугиране при 12,000 x g за 60 секунди. Супернатантите се отстраняват, клетките се ресуспендират в 1.0 ml 10.3 % захароза и се концентрират чрез центрофугиране при 12, 000 x g за 60 секунди и супернатантите се отстраняват. Клетките след това се ресуспендират в 0.25 ml TSE буфер, съдържащ 2 mg/ml лизозим и се инкубират на 37°C за 20 минути на клатач и се поставят в автоматичен апарат за изолиране на нуклеинови киселини AutoGen 540™. Плазмидната ДНК се изолира

чрез използване на Cycle 106 (нагласен чрез софтуеарно оборудване) съгласно инструкциите на производителя.

Освен това, 1.5 ml от мицелите се поставя в 1.5 ml микроцентрифужни епруветки и клетките се концентрират, чрез центрофугиране при 12, 000 x g за 60 секунди. Супернатантата се отстранява, клетките се ресуспендират в 1.0 ml 10.3 % захароза и се концентрират, чрез центрофугиране при 12, 000 x g за 60 секунди и супернатантата се отстранява. Клетките се ресуспендират в 0.5 ml TSE буфер, съдържащ 2 mg/ml лизозим и се инкубират на 37 ° C за 15-30 минути. След инкубацията 0.5 ml алкален SDS (0.3N NaOH, 2% SDS) се добавя и клетките се инкубират на 55 ° C за 15-30 минути или докато не се избистри разтвора. Натриев ацетат (0.1 ml, 3M, pH 4.8) се добавя към ДНК разтвора, който след това се инкубира на лед за 10 минути. ДНК пробите се центрофугират при 14,000 rpm за 10 минути на 5 ° C. Супернатантите се прехвърлят в чиста епруетка и 0.2 ml фенол/хлороформ (50 % фенол: 50 % хлороформ) се добавят и се смесват внимателно. ДНК разтвора се центрофугира при 14, 000 rpm за 10 минути на 5 ° C и горния слой се прехвърля в чиста Епендорф епруетка. Добавя се изопропанол (0.75 ml) и разтвора внимателно се смесва, и след това се инкубира на стайна температура за 20 минути. ДНК разтвора се центрофугира на 14, 000 rpm за 15 минути на 5 ° C, супернатантата се отстранява и ДНК утайката се промива със 70 % етанол, изсушава се и се ресуспендира в ТЕ буфер.

7.1.4. ИЗОЛИРАНЕ НА ПЛАЗМИДНА ДНК ОТ E. COLI

Единична трансформирана колония на *E.coli* се инокулира в 5 ml. Luria-Bertani (LB) среда (Bacto-Tryptone - 10 g, Bacto-yeast extract - 5 g и NaCl-10 g в 1 литър dH₂O, pH 7.0, автоклавирана при 121 ° C за 25

минути и допълнена със 100 µg/ml ампицилин). Културите се инкубират цяла нощ и алиkvота от 1 ml се поставя в 1.5 ml микроцентрифужна епруветка. Пробите от културата се поставят в автоматичен апарат за изолиране на нуклеинови киселини AutoGen 540 TM и плазмидната ДНК се изолира, като се използва Cycle 3 (нагласен чрез софтуеарно оборудване) съгласно инструкциите на производителя.

7.1.5. ПРИГОТВЯНЕ И ТРАНСФОРМАЦИЯ НА ПРОТОПЛАСТИ НА

S. AVERMITILIS

Единични колонии от *S. avermitilis* се изолират от 1/2 устойчив YPD-6. Мицелите се използват за инокулиране в 10 ml TSB среда в 25 mm x 150 mm епруветка, която след това се инкубира на клатач (300 rpm) на 28 ° C за 48 часа. Един ml от мицелите се използва за инокулиране в 50 ml YEME среда. Един литър YEME среда съдържа: Difco Yeast Extract - 3 g; Difco Bacto-peptone - 5 g; Difco Malt Extract - 3 g; захароза - 300 g. След автоклавиране при 121 ° C за 25 минути, се добавят още: 2.5 M MgCl₂·6H₂O (отделно автоклавиран при 121 ° C за 25 минути) - 2 ml и глицин (20 %) (стерилизиран чрез филтруване) - 25 ml.

Мицелите се култивират на 30 ° C за 48-72 часа и се събират, чрез центрофугиране в 50 ml центрофужни епруветки (Falcon) при 3,000 rpm за 20 минути. Супернатантите се отстраняват и мицелите се ресуспендират в Р буфер, който съдържа: захароза - 205 g; K₂SO₄ - 0.25 g; MgCl₂·6H₂O - 2.02 g; H₂O - 600 ml; K₂PO₄ (0.5 %) - 10 ml, "разтвор на микроелементи" - 20ml, CaCl₂·2H₂O - 100 ml и MES буфер (1.0 M pH 6.5) - 10 ml. "Разтвор на Микроелементи" в един литър съдържа: ZnCl₂ - 40 mg; FeCl₃·6H₂O - 200 mg; CuCl₂·2H₂O - 10 mg; MnCl₂·4H₂O - 10 mg; Na₂B₄O₇·10H₂O - 10 mg; (NH₄)₆Mo₇O₂₄·4H₂O - 10 mg). pH се нагласява до

05:03:02

6.5, крайния обем се нагласява до 1 литър и средата се филтрува затоплена през 0.45 микронов филтър.

Мицелите се утаяват при 3,000 грт за 20 минути, супернатантата се отстранява и мицелите се ресуспендират в 20 ml буфер Р, който съдържа 2 mg/ml лизозим. Мицелите се инкубират на 35 ° С за 15 минути на клатач, и се проверяват микроскопски за да се установи степента на формиране на протопласт. Когато протопластът се е уформил напълно, протопластите се центрофугират при 8, 000 грт за 10 минути. Супернатантата се отстранява и протопластите се ресуспендират в 10 ml буфер Р. Протопластите се центрофугират при 8, 000 грт за 10 минути, супернатантите се отстраняват, протопластите се ресуспендират в 2 ml буфер Р и около 1×10^9 протопласти се разпределят в 2.0 ml криогенни фиолки (Nalgene).

Фиолка с 1×10^9 протопласти се центрофугира при 8, 000 грт за 10 минути, супернатантата се отстранява и протопластите се ресуспендират в 0.1 ml буфер Р. Два до пет μg от трансформираната ДНК се добавя към протопластите, веднага последвана от добавянето на 0.5 ml работен Т буфер. Основният Т буфер съдържа: PEG-1000 (Sigma) - 25 g; захароза - 2.5 g; H_2O - 83 ml. рН се нагласява до 8.8 с 1N NaOH (стерилизирана, чрез филтруване) и основния Т буфер се стерилизира чрез филтруване и се съхранява на 4 ° С. Работния Т буфер, използван и приготвен същия ден, е: основен Т буфер - 8.3 ml; K_2PO_4 (4mM) - 1.0 ml; $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (5M) - 0.2 ml и TES (1M, рН 8) - 0.5 ml. Всеки компонент на работния Т буфер се стерилизира индивидуално чрез филтруване.

До 20 секунди след добавяне на Т буфера, към протопластите също се добавя 1.0 ml Р буфер и протопластите се центрофугират при 8,000 грт за 10 минути. Супернатантата се отстранява и протопластите се ресуспендират в 0.1 ml буфер Р. Протопластите след това се поставят в RM 14 среда, която съдържа захароза - 205 g; K_2SO_4 - 0.25 g;

MgCl₂·6H₂O - 10.12 g; глюкоза - 10 g; Difco casamino acids - 0.1g, Difco Yeast Extract - 5g, Difco Oatmeal Agar - 3g, Difco Bacto Agar - 22 g; dH₂O - 800 ml. Разтворът се автоклавира при 121 ° C за 25 минути. Към стерилните стокове след автоклавиране се добавят: K₂PO₄ (0.5 %) - 10 ml; CaCl₂·2H₂O (5M) - 5 ml; L- пролин (20 %) - 15 ml; MES буфер (1.0 M pH 6.5) - 10 ml, Разтвор на Микроелементи (същите като горепосочените) - 2 ml, сток на циклохексамид (25 mg/ml) - 40 ml и 1N NaOH - 2ml. Двадесет и пет ml от RM14 средата се разпределя на аликвоти за петри и петритата се сушат 24 часа преди използване.

Протопластите се инкубират при 95 % влажност на 30 ° C за 20-24 часа. За селекция на тиострептон резистентни трансформанти, се добавя 1 ml постилащ буфер, към всички RM 14 петрита, съдържащ 125 µg/ml тиострептон. Постилащият буфер съдържа на 100 ml: захароза - 10.3 g, разтвор на микроелементи (същите като горепосочените) - 0.2 ml и MES (1M, pH 6.5) - 1 ml. Протопластите се инкубират на 95 % влажност на 30 ° C за 7-14 дни, докато тиострептон резистентните (Thio^r) колонии не станат видими.

7.1.6 ТРАНСФОРМАЦИЯ НА ПРОТОПЛАСТИ НА

STREPTOMYCES LIVIDANS

S. lividans TK64 (доставен от John Innes Institute, Norwich, U.K) се използват за трансформации в някои случаи. Методи и състави за култивиране, получаване на протопласти и трансформиране на *S. lividans* са описани в Hopwood et al., 1985, Genetic Manipulation of Streptomyces, A Laboratory Manual, John Innes Foundation, Norwich, U.K. и се приготвят както е описано тук. Плазмидната ДНК се изолира от трансформанти на *S. lividans* както е описано в Глава 7.1.3, по-горе.

7.1.7. АНАЛИЗ НА ФЕРМЕНТАЦИЯТА ПРИ ЩАМОВЕ НА *S. AVERMITILIS*

Мицелите на *S. avermitilis*, образувани върху 1/2 устойчива YPD-6 среда за 4-7 дни се инокулират в 1 x 6 инчови епруветки, съдържащи 8 ml от предварително приготвената среда и върху 2.5 mm стъклени топчета. Предварително приготвената среда съдържа: разтворено нишесте (тънкослойно сварено нишесте или KOSO, Japan Com Starch Co Nagoya) - 20 g/L; Pharmamedia - 15 g/L; Ardamine pH - 5 g/L (Champlain Ind., Clifton, NJ); CaCO_3 - 2 g/L; 2 x bcfa ("bcfa" се отнася до разклонената мастнокиселинна верига, съдържаща крайна концентрация в средата от 50 ppm 2-(+)-метил маслена киселина, 60 ppm изомаслена киселина и 20 ppm изовалерианова киселина. pH се нагласява до 7.2 и средата се автоклавира на 121°C за 25 минути.

Епруветката се оставя на клатач при 215 rpm поставена под ъгъл 17° на 29°C за 3 дена. Аликвоти от по 2 ml от културата се използват за инокулиране в 300 ml Ерленмайерова колба, съдържаща 25 ml от среда за продукция, която съдържа: нишесте (тънкослойно сварено или KOSO) - 160 g/L; Nutrisoy (Archer Daniels Midland, Decatur, IL) - 10 g/L; K_2PO_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; 2 x bcfa (както е посочено по-горе); и циклохексан карбоксилоната киселина (CHC) (приготвена като 20 % разтвор с pH 7.0) - 800 ppm. pH се нагласява до 6.9 и средата се автоклавира при 121°C за 25 минути.

След инокулирането, колбата се инкубира на 29°C за 12 дена на клатач при 200 rpm. След инкубацията, 2 ml от пробата се взема от колбата, разтваря до 8 ml в метанол, смесва се и сместа се центрофугира при $1,250 \times g$ за 10 минути докато се утаи. Супернатантата се анализира чрез HPLC, чрез използване на Beckman Ultrasphere ODS колона (25 cm x 4.6 mm ID) със скорост на потока 0.75 ml/min и се детектира чрез

абсорбция при 240 nm. Подвижната фаза е 86/8.9/5.1 метанол/вода/ацетонитрил.

7.1.8 ИЗОЛИРАНЕ НА PKS ГЕНИ НА *S. AVERMITILIS*

Козмидна библиотека на хромозомната ДНК на *S. avermitilis* (ATCC 31272, SC-2) е направена, чрез хибридизация с кетосинтезна (KS) сонда, направена от фрагмент на поликетидния синтезген (PKS) на *Saccharopolyspora erythraea*. Подробно описание на изготвянето на козмидни библиотеки може да бъде намерено в Sambrook et al., 1989, по-горе. Подробно описание на приготвянето на хромозомни ДНК библиотеки на *Streptomyces* е представено в Horwood et al., 1985, по-горе. Козмидни клонове, съдържащи кетосинтезния район за хибридизацията са идентифицирани чрез хибридизация към 2.7 Kb NdeI/Eco47III фрагмент от pEX26 (любезно предоставен от Dr. P. Leadlay, Cambridge, UK). Приблизително 5 ng от pEX26 се подлага на рязане с NdeI и Eco47III. Реакционната смес се поставя в 0.8 % SeaPlaque GTG агарозен гел (FMC BioProducts, Rockland, ME). 2.7 Kb NdeI/Eco47III фрагмент се изрязва от гела след електрофорезата и ДНК се изолира от гела, чрез използване на GELase™ от Epicentre Technologies, чрез използване на "Бърз протокол". 2.7 Kb NdeI/Eco47III фрагмент се бележи с [α - ^{32} P]dCTP (дезоксицитидин 5'-трифосфат, тетра (триетиламониева) сол [α - ^{32} P]-) (NEN-Dupont, Boston, MA), чрез използване на BRL Nick Translation System (BRL Life Technologies, Inc. Gaithersburg, MD) следвайки инструкциите на доставчика. Типичната реакция се осъществява в 0.05 ml обем. След добавяне на 5 μ l Stop буфер, белязаната ДНК се отделя от неинкорпорираните нуклеотиди, чрез използване на G-25 Sephadex Quick Spin™ Колона (Boehringer Mannheim) следвайки инструкциите на доставчика.

Приблизително около 1,800 козмидни клона се скринират чрез колонна хибридизация. Десет колонии се идентифицират по високата си степен на хибридизация към KS сондата от *Sacc. erythraea*. *E.coli* колонииите, съдържащи козмидната ДНК се култивират в LB течна среда и козмидната ДНК се изолира от всяка култура в автоматичен апарат за изолиране на нуклеинови киселини AutoGen 540™, чрез използване на Cycle 3 (нагласен чрез софтуеарно оборудване) съгласно инструкциите на производителя. Ендонуклеазно рестазно картиране и анализ чрез Southern блот хибридизация се провеждат, така че пет от клоновете, да съдържат припокриващи се хромозомални участъци. Bam HI геномната рестазна карта на *S. avermitilis* на пет козмида (т.е. pSE65, pSE66, pSE67, pSE68, pSE69) е конструирана чрез анализ на припокриващите се козмиди и хибридизиращи райони (ФИГУРА 4).

7.1.9 ИДЕНТИФИЦИРАНЕ НА ДНК, КОЯТО МОДУЛИРА СЪОТНОШЕНИЕТО B2:B1 НА АВЕРМЕКТИНИТЕ И ИДЕНТИФИЦИРАНЕ НА ORF НА aveC

Следващите методи се използват за проверка на субклонирани фрагменти, с произход от pSE66 козмидния клон, за тяхната способност да модулират авермектиновото съотношение B2:B1 в AveC мутанти. pSE66 (5µg) се изрязва с SacI и BamHI. Реакционната смес се нанася върху 0.8 % SeaPlaque™ GTG агарозен гел (FMC BioProducts), 2.9 Kb SacI/ BamHI фрагмент се изрязва от електрофоретичния гел и ДНК се изолира от гела, чрез GELase™ (Eprcentre Technologies), чрез използване на "Бърз Протокол". Приблизително 5 µg от "shuttle" вектора pWHM3 (Vara et al., 1989, J.Bacteriol. 171:5872-5881) се подлага на рязане със SacI и BamHI. Около 0.5 µg от "insert"-а с размери 2.9 Kb и 0.5 µg от линеализирания

pWHM3 се смесват заедно и се инкубират за една нощ с 1 единица лигаза (New England Biolabs, Inc., Beverly, MA) при 15°C в краен обем от 20 μl , съгласно инструкциите на доставчика. След инкубацията 5 μl от лигазната смес се инкубират на 70°C за 10 минути, охлаждат се на стайна температура и се използват за трансформиране на компетентни клетки *E.coli* DH5 α (BRL), съгласно инструкциите на производителя. Плазмидната ДНК се изолира от ампицилин резистентните трансформанти и присъствието на 2.9 Kb SacI/BamHI "insert" се потвърждава, чрез рестриктазен анализ. Плазмидът се означава като pSE119.

Протопласти на *S. avermitilis* щам 1100-SC38 (Pfizer in-house щам) се приготвят и трансформират с pSE119 както е описано в Глава 7.1.5 по-горе. Щам 1100-SC38 е мутантен и продуцира значително повече от авермектин циклохексил B2 в сравнение с авермектин циклохексил B1, когато е добавена циклохексан карбоксилна киселина (B2:B1 около 30:1). pSE119, използван за трансформиране на протопласти от *S. avermitilis*, се изолира от *E.coli* щам GM2163, получен от Dr. B.J. Bachman, Curator, E.coli Genetic Stock Center, Yale University, *E.coli* щам DM1 (BRL) или от *S. lividans* щам TK64. Трансформантите, резистенти към тиострептон от щам 1100-SC38 са изолирани и анализирани, чрез HPLC анализ на продуктите на ферментацията. Трансформантите на *S. avermitilis* щам 1100-SC38 носещи pSE119, продуцират авермектини с променено съотношение циклохексил-B2 : циклохексил B1 от около 3.7:1 (ТАБЛИЦА 2).

Веднъж установено че pSE119 е способен да модулира съотношението B2:B1 на авермектините в AveC мутант, въведената ДНК е секвенирана. Около 10 μg от pSE119 са изолирани, чрез използване на кит за изолиране на плазмидна ДНК (Qiagen, Valenca, CA) следвайки инструкциите на производителя и ДНК е секвенирана, чрез използване

на ABI 373A Автоматичен ДНК секвенатор (Perkin Elmer, Foster City, CA). Данните от секвенирането се събират и редактират чрез използване на Genetic Computer Group програми (GCG, Madison, WI). ДНК секвенцията и ORF на aveC са представени на ФИГУРА 1 (SEQ ID NO: 1).

Нов плазмид, означен като pSE118 е конструиран както следва. Приблизително 5 µg от pSE66 се подлагат на рязане със SphI и Bam HI. Реакционната смес се нанася върху 0.8 % SeaPlaque™ GTG агарозен гел (FMC BioProducts), 2.8 Kb SphI/ BamHI фрагмент се изрязва от електрофоретичния гел и ДНК се изолира от гела, чрез използване на GELase™ (Eprcentre Technologies), чрез използване на "Бърз Протокол". Приблизително 5 µg от "shuttle" вектора pWHM3 се подлага на рязане със SphI и BamHI. Около 0.5 µg от 2.8 Kb "insert" и 0.5 µg от линеализирания pWHM3 се смесват заедно и се инкубират за една нощ с 1 единица лигаза (New England Biolabs) при 15 °C в краен обем от 20 µl, съгласно с инструкциите на доставчика. След инкубацията 5 µl от лигазната смес се инкубират на 70 °C за 10 минути, охлажда се на стайна температура и се използват за трансформиране на компетентни клетки *E.coli* DH5α, съгласно инструкциите на производителя. Плазмидната ДНК се изолира от ампицилин резистентните трансформанти и присъствието на 2.8 Kb SphI/ BamHI "insert" се потвърждава, чрез рестриктазен анализ. Плазмидът се означава като pSE118. Въведените ДНК във pSE118 и pSE119 се припокриват в област от 838 нуклеотида (ФИГУРА 4).

Протопласти на *S.avermitilis* шам 1100-SC38 са трансформирани с pSE118, както е описано по-горе. Трансформантите, резистенти към тиострептон от шам 1100-SC38 са изолирани и анализирани, чрез HPLC анализ на продуктите на ферментацията. Трансформантите от *S.avermitilis* шам 1100-SC38, носещи pSE118 нямат

променено съотношение авермектини циклохексил-B2 : авермектин циклохексил-B1, в сравнение със щам 1100-SC38 (ТАБЛИЦА 2).

7.1.10 PCR АМПЛИФИКАЦИЯ НА aveC ГЕНА ОТ ХРОМОЗОМНАТА ДНК НА *S. AVERMITILIS*

Около ~ 1.2 Kb фрагмент, съдържащ ORF на aveC е изолиран от хромозмната ДНК на *S. avermitilis*, чрез PCR амплификация с използване на праймерите, приготвени на базата на aveC нуклеотидната последователност, получена по-горе. PCR праймерите са доставени от Genosys Biotechnologies, Inc. (Texah). Праймерът за четене отляво на ляво (5'-3') праймерът е: 5'-TCACGAAACCGGACACAC-3' (SEQ ID NO:6); и праймерът за четене отляво на дясно (3'-5') е 5'-CATGATCGCTGAACCGAG-3' (SEQ ID NO:7). PCR реакцията се осъществява с DeepVent™ полимераза (New England Biolabs) в буфер, доставен от производителя, и в присъствието на 300 µM dNTP, 10 % глицерол, 200 pmol от всеки праймер, 0.1 µg матрица и 2.5 единици ензим, в краен обем 100 µl, чрез използване на Perkin-Elmer Cetus PCR апарат. Температурният профил на всеки цикъл е 95 ° C за 5 минути (стъпка на денатурация), 60 ° C за 2 минути (стъпка на хибридикация) и 72 ° C за 2 минути (стъпка на елонгация). Следващите 24 цикъла имат подобен температурен профил, с изключение на стъпката на денатурация, която е скъсена до 45 секунди и стъпката на хибридизация скъсена до 1 минута.

PCR продуктът се разделя чрез електрофореза в 1 % агарозен гел и се детектира като единична ДНК ивица с размери ~ 1.2 kВ. Тази ДНК се пречиства от гела и се подлага на лигазна реакция с 25 ng от линеализиран pCR-Blunt вектор (Invitrogen) в моларно съотношение между вектора и "insert"-а 1:10, следвайки инструкциите на

производителя. Лигазната смес се използва за трансформация на One Shot™ *E.coli* компетентни клетки (Invitrogen), следвайки инструкциите на производителя. Плазмидната ДНК се изолира от ампицилин резистентните трансформанти и присъствието на ~ 1.2 kB "insert" се потвърждава от рестриктазен анализ. Този плазмид се означава, като pSE179.

ДНК "insert"-ът от pSE179 е изолиран, чрез рязане с Bam HI/Xba I, разделен е електрофоретично, пречистен е от гела и е подложен на лигазна реакция с "shuttle" вектора pWHM3, който е линеализиран в местата Bam HI/Xba I, като крайната концентрация на ДНК при лигазната реакция е 1 µg, а моларните съотношения "insert"-вектор са 1:5. Лигазната смес се използва за трансформация на компетентни *E.coli* DH5α клетки, съгласно инструкциите на производителя. Плазмидната ДНК е изолирана от ампицилин резистентните трансформанти и наличието на 1.2 Kb "insert" се потвърждава чрез рестриктазен анализ. Този плазмид, означен като pSE 186 (ФИГУРА 2, ATCC 209604) е трансформиран в *E.coli* DM1 и плазмидната ДНК се изолира от ампицилин резистентните трансформанти.

7.2. РЕЗУЛТАТИ

2.9 Kb SacI/BamHI фрагмент от pSE119 е идентифициран, когато е трансформиран в *S. avermitilis* щам 1100-SC38 по това че значително променя съотношението B2:B1 на получените авермектини. *S. avermitilis* щам 1100-SC38 нормално продуцира B2:B1 в съотношение около 30 : 1, но когато е трансформиран с вектор, включващ 2.9 Kb SacI/BamHI фрагмент, съотношение на авермектините B2:B1 намалява до

3.7.1. Пост-ферментационен анализ на трансформираните култури потвърждава присъствието на трансформирана ДНК.

Фрагментът с размери 2.9 Kb на pSE119 е секвениран и е идентифицирана ORF, която е ~ 0.9 Kb (ФИГУРА 1)(SEQ ID NO:1), която обхваща фрагмента PstI/SphI който е предварително мутирал, на такова място, че да води само до продукцията на B2 продукти (Ikeda et al., 1995, по-горе). Сравняването на ORF или на съответстващ на него произведен полипептид с известни такива от базата данни (GenEMBL, SWISS-PROT) не показва никаква значителна хомоложност с известните ДНК-ови или белтъчни последователности.

ТАБЛИЦА 2 показва анализа на ферментацията на *S. avermitilis* щам 1100-SC38, трансформиран с различни плазмиди.

ТАБЛИЦА 2

<i>S. avermitilis</i> щам (трансформиран с плазмиди)	Брой на проверените трансформанти	Средно съотношение B2:B1
1100-SC38 (нетрансформиран)	9	30.66
1100-SC38 (pWHM3)	21	31.3
1100-SC38 (pSE119)	12	3.7
1100-SC38 (pSE118)	12	30.4
1100-SC38 (pSE185)	14	27.9

8. ПРИМЕР ЗА ИЗПЪЛНЕНИЕ НА ИЗОБРЕТЕНИЕТО : КОНСТРУИРАНЕ

НА AveC МУТАНТИ НА *S.AVERMITILIS*

Този пример описва конструирането на няколко различни AveC мутанта на *S. avermilitis*, чрез използване на състави и методи описани по-горе. Общото описание на техниките за въвеждане на мутации в ген на *Streptomyces* са описани от Keiser и Hopwood, 1991, Meth. Enzym. 204:430-458. По-подробно описание е осигурено от Anzai et al., 1988, J.Antibiot. XLI(2):226-233 и от Stutzman-Engwall et al., 1992, J.Bacteriol. 174 (1):144-154. Тези справки са включени като цяло тук в литературната справка.

8.1. ИНАКТИВИРАНЕ НА AveC ГЕНА НА *S. AVERMITILIS*

Конструирани са AveC мутанти, носещи инактивирани aveC гени, чрез използване на няколко метода, описани по-долу.

В първия метод, SphI/PstI фрагментът с големина 640 нд, който е в областта на aveC гена на pSE119 (плазмид описан в Глава 7.1.9., по-горе) се замества с ErmE гена (отговарящ за резистентност към еритромицин) на *Sacc. erythraea*. ErmE генът е изолиран от pIJ4026 (доставен от John Innes Institute, Norwich, U.K; виж също Bibb et. al., 1985, Gene 41:357-368), чрез рестриктазно рязане с BglII и EcoRI, последвано от електрофореза, след което е пречистен от гела. Този фрагмент, с размери ~ 1.7 Kb е положен на лигазна реакция с pGEM72f (Promega), който е линеализиран с Bam HI и Eco RI и местата и продуктът на лигазната реакция е трансформиран в компетентни клетки на *E.coli* DH5 α , съгласно инструкциите на производителя. Плазмидната ДНК е изолирана от ампицилин резистентните трансформанти и

присъствието на ~1.7 Kb "insert" се потвърждава с рестриктазен анализ. Този плазмид се означава като pSE27.

pSE118 (описан в Глава 7.1.9, по-горе) е подложен на рязане с SphI и Bam HI, продуктите на рязането се разделят електрофоретично и "insert"-ът с размери ~ 2.8 Kb SphI/Bam HI е изолиран от гела. pSE119 е подложен на рязане с PstI и Eco RI, продуктите на рязането се разделят електрофоретично и "insert"-ът с размери ~ 1.5 Kb PstI/Eco RI е изолиран от гела. "Shuttle" векторът pWHM3 е линеализиран с Bam HI и Eco RI. pSE27 е подложен на рязане с PstI и SphI, продуктите на рязане се разделят електрофоретично и "insert"-ът с размери ~1.7 Kb PstI/SphI е изолиран от гела. И четирите фрагмента (т.е. тези с размери ~ 2.8 Kb, ~ 1.5 Kb, ~ 7.2 Kb и ~1.7 Kb) се подлагат на лигазна реакция за свързване на четири фрагмента. Продуктът на лигазната реакция се трансформира в компетентни клетки на E.coli DH5 α , следвайки инструкциите на производителя. Плазмидната ДНК се изолира от ампицилин резистентните трансформанти и присъствието на правилно ориентиран "insert" се потвърждава от рестриктазен анализ. Този плазмид е означен с pSE180 (ФИГУРА 3; ATCC 209605).

pSE180 се трансформира в *S.lividans* TK64 и трансформираниите колонии се идентифицират на база на тяхната резистентност към тиострептон и еритромицин. pSE180 е изолиран от *S.lividans* и се използва за трансформация на протопласти на *S. avermitilis*. Четири тиострептон резистентни трансформанта на *S. avermitilis* са идентифицирани и протопластите са приготвени като посевка в RM 14 среда при неселективни условия. След като се образуват, протопластните единични колонии са скринирани за наличието на резистентност към еритромицин и отсъствието на резистентност към тиострептон, което показва интегрирането на инактивирания aveC ген в хромозомата и загубата на свободен

репликон. Един *Erm^rThio^s* трансформант е идентифициран и означен като щам SE180-11. Тоталната хромозомна ДНК се изолира от щам SE180-11, подлага се на рестриктазно рязане с ензимите *Bam* H1, *Hind* III, *Pst*I, или *Sph*I, след което продуктите на рязането се разделят електрофоретично в 0.8 % агарозен гел, прехвърлят се върху найлонови мембрани и се подлагат на хибридизация с *ermE* сонда. Тези анализи показват, че интегрирането на *ermE* гена за резистентност и съпътстващата делеция на фрагмент *Pst*I/*Sph*I с размери 640 нд са се появили в резултат на двойно прекръстосване. HPLC анализът на продуктите на ферментацията на щам SE180-11 показва, че нормалните авермектини повече не се получават (ФИГУРА 5А).

Във втори метод за инактивиране на *aveC* гена, 1.7 Kb *ermE* ген е отстранен от хромозомата на *S. avermitilis* щам SE180-11, оставяйки делецията на фрагмента *Pst*I/*Sph*I с размери 640 нд в *aveC* гена. Конструиран е плазмид за заместване на гени, както следва: *pSE* 180 се подлага на частично рестриктазно рязане с *Xba* I и фрагментът с размери ~ 11.4 Kb се изолира от гела. В този ~ 11.4 Kb фрагмент липсва генът за резистентност *ermE*, който е с размери 1.7 Kb. След това ДНК се подлага на лигазна реакция и се трансформира в компетентни клетки на *E. coli* DH5 α . Плазмидната ДНК се изолира от ампицилин резистентните трансформанти и присъствието на правилен "insert" се потвърждава от рестриктазния анализ. Този плазмид, който се означава като *pSE*184, се трансформира в *E. coli* DM1 компетентни клетки, и плазмидната ДНК се изолира от ампицилин резистентните трансформанти. Този плазмид се използва за трансформация на протопласти на *S. avermitilis* щам SE180-11. Протопластите се приготвят от тиострептон резистентните трансформанти на щам SE180-11 като посевка, като единични колонии в RM 14 среда. След като се образуват, протопластните единични колонии са скринирани за отсъствието на

резистентност към еритромицин и отсъствието на резистентност към тиострептон, което показва интегрирането на инактивирания *aveC* ген в хромозомата и загубата на свободния репликон, носещ *ErmE* гена. Един *Erm^sThio^s* трансформант е идентифициран и означен като щам SE184-1-13. Анализът на ферментацията на щам SE184-1-13, показва, че нормалните авермектини не се получават и че SE184-1-13 има същия профил на ферментация, както като SE180-11.

В трети метод за инактивиране на *aveC* гена, в хромозомалния *aveC* ген се въвежда променена рамка на четене, чрез добавяне на два Гуанина (Gs) след Цитозина (C) в нуклеотиден тип (нт) позиция 471, чрез използване на PCR, като по този начин се създава ново BspE1 място. Присъствието на конструираното BspE1 място се използва за насочването на генното заместване. PCR праймерите са доставени от Genosys Biotechnologies, Inc. Праймерът за четене от дясно наляво (5'-3') е: 5'-GGTTCCGGATGCCGTTCTCG-3' (SEQ ID NO:8) и праймерът за четене отляво надясно (3'-5') е 5'-AACTCCGGTCGACTCCCCTTC-3' (SEQ ID NO:9). Условиата на PCR са описани в Глава 7.1.10 по-горе. PCR продуктът с размери 666 н.д. се подлага на рязане с SphI за да се получат два фрагмента с размери 278 нд и съответно 388 нд. Фрагментът с размери 388 нд се изолира от гела.

Плазмидът за заместване на гени е конструиран, както следва: "shuttle" векторът pWHM3 се линеализира с EcoRI и Bam HI. pSE 119 се подлага на рязане с Bam HI и SphI, продуктите на рязането се разделят електрофоретично и фрагментът от 840 нд се пречиства от гела. pSE119 се подлага на рязане с Eco RI и XmnI, продуктите на рязане се разделят електрофоретично и ~ 1.7Kb фрагмент се изолира от гела. И четирите фрагмента (т.е. ~ 7.2 Kb, ~840 нд, ~1.7 Kb и ~388 нд) се подлагат на лигазна реакци за свързване на четири фрагмента. Лигазната смес се трансформира в компетентни клетки на E.coli DH5α.

Плазмидната ДНК се изолира от ампицилин резистентните трансформанти и присъствието на правилно ориентиран "insert" се потвърждава от рестриктазен анализ и анализ чрез ДНК секвениране. Този плазмид, който е означен като pSE185 се трансформира в *E.coli* DM1 компетентни клетки, и плазмидната ДНК се изолира от ампицилин резистентните трансформанти. Този плазмид се използва за трансформация на протопласти на *S. avermitilis* щам 1100-SC38. Тиострептон резистентните трансформанти на щам 1100-SC38 се изолират и се анализират, чрез HPLC анализ на продуктите на ферментацията. pSE185 не променя значително съотношенията B2:B1 на авермектините, когато е трансформиран в *S. avermetilis* щам 1100-SC38 (ТАБЛИЦА 2).

pSE185 се използва за трансформиране на протопласти на *S. avermitilis*, с цел създаването на мутация, която променя рамката на четене на *aveC* гена в хромозомата. Протопластите се приготвят от тиострептон резистентните трансформанти като посевка, като единични колонии в RM 14 среда. След образуването им, протопластните единични колонии се скринират за отсъствието на резистентност към тиострептон. Хромозомната ДНК от тиострептон чувствителните колонии се изолира и се скринира чрез PCR за присъствието на мутация, която води до промяна на рамката на четене, интегрирана в хромозомата. PCR праймерите са приготвени на базата на *aveC* нукелотидната последователност, и са доставени от Genosys Biotechnologies, Inc. (Texas). Праймерът за четене отдясно наляво (5'-3') е 5'- GCAAGGATACGGGGACTAC-3' (SEQ ID NO:10) и праймерът за четене отляво надясно (3'-5') е 5'-GAACCGACCGCCTGATAC -3'(SEQ ID NO:11), като условията на PCR са описани в Глава 7.1.10 по-горе. Полученият PCR продукт е с размери 543 нд и при рязане с BspE1 се получават три фрагмента с размери 368 нд, 96 нд и 79 нд., което показва

интегриране на инактивирания aveC ген в хромозомата и загуба на трите репликона.

Анализа на ферментацията на мутанти на *S. avermitilis*, носещи мутация, която променя рамката на четене в aveC гена, показва че нормалните авермектини вече не се получават и че тези мутанти имат същия HPLC профил, като щамове SE180-11 и SE184-1-13. Един Thio^s трансформант е идентифициран и означен, като щам SE185-5a.

В допълнение, създадена е мутация в aveC гена, която променя нт позиция 520 от G в A, което води до промяна на кодона кодиращ триптофан (W) в позиция 116 в кодон за терминация. Щам на *S. avermitilis*, който носи тази мутация не продуцира нормални авермектини и има същия профил на ферментация, като този на щамове SE180-11, SE184-1-13 и SE 185-5a.

В допълнение, мутациите в AveC гена, които променят: (i) нт позиция 970 от G в A, която променя аминокиселинната позиция 266 от глицин (G) в аспартат (D) и (ii) нт позиция 996 от T в C, която променя аминокиселинна позиция 275 от тирозин (Y) в хистидин (H). Щам на *S. avermitilis* с тези мутации (G256D/Y275H) не продуцира нормални авермектини и има същия профил на ферментация като щамове SE 180-11, SE 184-1-13 SE и SE 185-5a.

Мутантите на щамове на *S. avermitilis* щамове, с инактивиран aveC - SE 180-11, SE 184-1-13 SE и 185-185-5a и други осигурени тук, осигуряват скрининг пособия за изследване на влиянието на други мутации в aveC гена. pSE 186, който съдържа копие от дивия тип aveC ген, е трансформиран в *E. coli* DM1 и плазмидната ДНК е изолирана от ампицилин резистентните трансформанти. Тази pSE 186 ДНК се използва за трансформиране на протопласти на *S. avermitilis* щам SE 180-11. Тиострептон резистентните трансформанти на протопластите на щам SE 180-11 са изолирани, и се определя наличието на резистентност

към еритромицин, и Thio^r Erm^r трансформантите се анализират чрез HPLC анализ на продуктите на ферментацията. Наличието на функционален *aveC* ген в трансформантите дава възможност за възстановяване на нормалната авермектинова продукция от щам SE 180-11 (ФИГУРА 5B).

8.2. АНАЛИЗ НА МУТАЦИИТЕ В *aveC* ГЕНА, КОИТО ПРОМЕНЯТ СЪОТНОШЕНИЯТА КЛАС B2:B1

Както е описано по-горе, *S. avermitilis* щам SE 180-11 съдържа инактивиран *aveC* ген, който се допълва чрез трансформация с плазмид съдържащ функционален *aveC* ген (pSE186). Щамът SE 180-11 също е пригоден като щам-гостоприемник за характеризиране на други мутации в *aveC* гена, както е описано по-долу.

Хромозомната ДНК е изолирана от щам 1100-SC38 и използвана като матрица за PCR амплификация на *aveC* гена. 1.2 Kb ORF е изолирана, чрез PCR амплификация, чрез използване на праймери, създадени на базата на за *aveC* нуклеотидната последователност. Праймерът за четене отляво на ляво (5'-3') е SEQ ID NO:6 и праймерът за четене отляво на дясно (3'-5') е SEQ ID NO:7 (виж Глава 7.1.10 по-горе). Условиата за PCR и субклонирането са описани в Глава 7.1.10. Анализът чрез ДНК секвениране на 1.2 Kb ORF показва мутация в *aveC* гена, която променя нуклеотиден тип позиция 337 от С в Т, което води до промяна в аминокиселинна позиция 55 от серин (S) във фенилаланин (F). *AveC* гена, съдържащ S55F мутацията е субклониран в pWHM3 с цел създаване на плазмид, който е означен като pSE187 и който се използва за трансформация на протопласти на *S. avermitilis* щам SE 180-11. Тиострептон резистентните трансформанти на протопластите на щам SE 180-11 са изолирани, и се определя наличието на

резистентност към еритромицин, и Thio^r Erm^r трансформантите се анализират чрез HPLC анализ на продуктите на ферментацията. Наличието на aveC ген, кодиращ промяната в аминокиселинния остатък 55 (S55F) дава възможност да се възстанови нормалната авермектинова продукция на щам SE 180-11 (Фиг. 5C); обаче съотношението между циклохексил B2 : циклохексил B1 е около 26:1, в сравнение със щам SE 180-11, трансформиран с pSE186, при който съотношението B2:B1 е около 1.6:6 (ТАБЛИЦА 3), което показва че единичната мутация (S55F) модулира количеството на циклохексил-B2 отнесено към количеството на циклохексил-B1.

Друга мутация в aveC гена е идентифицирана, че променя нуклеотиден тип позиция 862 от G в A, като това променя аминокиселината в позиция 230 от глицин (G) в аспартат (D). *S. avermitilis* щам, който има тази мутация (G230D) продуцира авермектини със съотношение B2:B1 около 30:1.

8.3. МУТАЦИИ, КОИТО РЕДУЦИРАТ СЪОТНОШЕНИЕТО B2:B1

Конструирани са няколко мутации, които редуцират количеството на циклохексил-B2 отнесено към количеството на циклохексил-B1, както следва.

Мутация в aveC гена е идентифицирана, че променя нуклеотиден тип в позиция 588 от G в A, като тази промяна води до заместване на аминокиселината в позиция 139 от аланин (A) в треонин (T). AveC генът, който съдържа мутацията A139T е субклонирен в pWHM3, за да се създаде плазмид, който е означен като pSE188 и който се използва за трансформация на *S. avermitilis* щам SE 180-11. Тиострептон резистентните трансформанти на щам SE 180-11 са изолирани, и се определя наличието на резистентност към еритромицин,

и Thio^r Erg^r трансформантите се анализират чрез HPLC анализ на продуктите на ферментацията. Наличието на мутирал aveC ген, кодиращ промяната в аминнокиселинния остатък 139 (A139T) дава възможност да се възстанови нормалната авермектинова продукция от щам SE 180-11 (Фиг. 5D); обаче съотношението между B2 : B1 е около 0.94:1, показващо че единичната мутация (A139T) редуцира количеството на циклохексил-B2 отнесено към количеството на циклохексил-B1. Този резултат е неочакван, тъй като публикуваните резултати, както и резултатите за мутациите описани по-горе показват само инактивиране на aveC гена или увеличена продукция на авермектин B2 отнесена към B1 формата (ТАБЛИЦА 3).

Тъй като мутацията A139T променя съотношенията B2:B1 в по-благоприятна за B1 посока, конструирана е мутация, която кодира треонин вместо серин в аминокиселинна позиция 138. Така pSE186 е подложен на рязане с EcoR1 и е клониран в pGEM3Zf (Promega) който е линеализиран с EcoR1. Този плазмид, означен като pSE186a, е подложен на рязане с AраI и KpnI, получените ДНК фрагменти са разделени в агарозен гел и двата фрагмента с размери ~ 3.8 Kb и от ~ 0.4 Kb са изолирани от гела. Фрагментът с размер ~ 1.2 Kb, въведен като ДНК от pSE186 се използва за PCR матрица, за въвеждане на единична базова промяна в нуклеотиден тип позиция 585. PCR праймерите са създадени да въведат мутация в нуклеотиден тип позиция 585 и са доставени от Genosys Biotechnologies, Inc. (Texas). Праймера за четене отляво на ляво (5'-3') праймерът е: 5'-GGGGGCGGGCCCGGGTGCGGAGGCGGAAATGCCCCTGGCGACG - 3' (SEQ ID NO:12); и праймерът за четене отляво на дясно (3'-5') е 5'-GGAACCGACCGCCTGATACA -3' (SEQ ID NO:13). PCR реакцията се осъществява чрез използването на Advantage GC genomic PCR кит (Clontech Laboratories, Palo Alto, CA) в буфер, доставен от

производителя, и в присъствието на 200 μ M dNTPs, 200 pmol от всеки праймер, 50 ng ДНК матрица, 1.0M GC-Melt и 1 единица Klen Taq полимеразна смес, в краен обем 50 μ l. Температурния профил на първия цикъл е 94 ° C за 1 минута, следван от 25 цикъла на 94 ° C за 30 секунди и 68 ° C за 2 минути и един цикъл 68 ° C за 3 минути. PCR продукта с размери 295 нд се подлага на рязане с ApaI и KpnI, за да се получи фрагмент с размери 254 нд, който се разделя чрез електрофореза и се пречиства от гела. Всичките три фрагмента (~ 3.8 Kb, ~ 0.4 Kb и 254 нд) се подлагат на лигазна реакция за свързване на три фрагмента. Продуктът на лигазната реакция се трансформира в компетентни *E.coli* DH5 α клетки. Плазмидната ДНК се изолира от ампицилин резистентните трансформанти и наличието на правилен "insert" се потвърждава от рестриктазен анализ. Този плазмид се означава като pSE198.

pSE198 се подлага на рязане с Eco RI, и е клониран в pWHM3, който е линеализиран с Eco RI и е трансформиран в клетки на *E.coli* DH5 α . Плазмидната ДНК се изолира от ампицилин резистентните трансформанти и наличието на правилен "insert" се потвърждава от рестриктазен анализ и анализ чрез ДНК секвениране. Плазмидната ДНК се трансформира в *E.coli* DM1, плазмидната ДНК се изолира от ампицилин резистентните трансформанти и наличието на правилен "insert" се потвърждава от рестриктазен анализ. Плазмидът означен като pSE199 се използва за трансформиране на протопласти на *S. avermitilis* щам SE 180-11. Тиострептон резистентните трансформанти на щам SE 180-11 са изолирани, и се определя наличието на резистентност към еритромицин, и Thio^r Eri^r трансформантите се анализират чрез HPLC анализ на продуктите на ферментацията. Наличието на мутирал aveC ген, кодиращ промяната в аминнокиселинния остатък 138 (S138T) дава възможност да се възстанови нормалната авермектинова продукция от

шам SE 180-11; обаче съотношението между B2 : B1 е около 0.88:1, показващо че единичната мутация (S138T) редуцира количеството на получения циклохексил-B2 отнесено към количеството на циклохексил-B1 (ТАБЛИЦА 3). Това съотношение B2:B1 е даже още по-ниско от съотношението 0.94:1, което се наблюдава при мутацията A139T, създадена от трансформацията на шам SE 180-11 с pSE188, както е описано по-горе.

Друга мутация е конструирана за едновременното въвеждане на треонин в двете аминокиселинни позиции 138 и 139. "Insert"-ът с размери 1.2 Kb от ДНК на pSE186 се използва за PCR матрица. PCR праймерите са създадени да въведат мутации в нуклеотиден тип позиции 585 и 588 и са доставени от Genosys Biotechnologies, Inc. (Texas). Праймерът за четене отлясно на ляво (5'-3') е: 5'-GGGGGCGGGCCCCGGGTGCGGAGGCGGAAATGCCGCTGGCGACGACCC -3' (SEQ ID NO:14); и праймерът за четене отляво на дясно (3'-5') е 5'-GGAACATCACGGCATTTCACC -3' (SEQ ID NO:15). PCR реакцията се осъществява при условия, описани непосредствено по-горе в тази Глава. PCR продукта, получен като от 449 нд се подлага на рязане с *ApaI* и *KpnI*, за да се освободи фрагмент с размери 254 нд, който се разделя чрез електрофореза и се изолира от гела. pSE186a, след което се подлага на рязане с *ApaI* и *KpnI*, ДНК фрагментите се разделят в агарозен гел и двата фрагмента с размери ~ 3.8 Kb и ~ 0.4 Kb се изолират от гела. Всичките три фрагмента (~ 3.8 Kb, ~ 0.4 Kb и 254 Kb) се подлагат на лигазна реакция за свързване на три фрагмента и продуктът от лигазната реакция се трансформира в компетентни клетки на *E.coli* DH5 α . Плазмидната ДНК се изолира от ампицилин резистентните трансформанти и наличието на правилен "insert" се

потвърждава от рестриктазния анализ. Плазмидът се означава като pSE230.

pSE230 се подлага на рязане с Eco R1, и е клониран в pWHM3, който е линеализиран с Eco R1 и е трансформиран в клетки на *E.coli* DH5 α . Плазмидната ДНК се изолира от ампицилин резистентните трансформанти и наличието на правилен "insert" се потвърждава от рестриктазния анализ и анализ чрез ДНК секвениране. Плазмидната ДНК се трансформира в *E.coli* DM1, плазмидната ДНК се изолира от ампицилин резистентните трансформанти, и наличието на правилен "insert" се потвърждава от рестриктазния анализ. Плазмидът означен като pSE231 се използва за трансформиране на протопласти на *S. avermitilis* щам SE 180-11. Тиострептон резистентните трансформанти на щам SE 180-11 са изолирани, и се определя наличието на резистентност към еритромицин, и Thio^r Eri^r трансформантите се анализират за продукти на ферментацията. Наличието на двойно мутирал aveC ген, кодиращ S138T/A139T дава възможност да се възстанови нормалната авермектинова продукция от щам SE 180-11; обаче съотношението между B2 : B1 е 0.84:1, показващо че тази мутация по-нататък редуцира количеството на получения циклохексил-B2 отнесено към количеството на циклохексил-B1 (ТАБЛИЦА 3) още повече от редукциите осигурени от трансформирания с pSE188 или pSE189 щам SE 180-11 с, които са описани по-горе.

Друга мутация е конструирана по-нататък да редуцира съотношението на циклохексил-B2 отнесено към количеството на циклохексил-B1. Тъй като мутациите S138T/A139T променят съотношенията B2:B1 в още по-благоприятна за B1 посока, конструирана е мутация за въвеждане на треонин в позиция 138 и фенилаланин в позиция 139. "Insert"-ът с размери ~ 1.2 Kb от pSE186 се използва за PCR матрица. PCR праймерите са създадени да въведат

мутации в нуклеотиден тип позиции 585 (променяща Т в А), 588 (променяща G в Т) и 589 позиция (променяща С в Т) и са доставени от Genosys Biotechnologies, Inc. (Texas). Праймерът за четене отляво на ляво (5'-3') е: 5'-GGGGGCGGGCCCCGGGTGCGGAGGCGGAAATGCCGCTGGCGACGT TC -3' (SEQ ID NO:25); и праймерът за четене отляво на дясно (3'-5') е 5'-GGAACATCACGGCATTCACC -3' (SEQ ID NO:15). PCR реакцията се осъществява чрез използването на Advantage GC genomic PCR кит (Clontech Laboratories, Palo Alto, CA) в буфер, доставен от производителя, и в присъствието на 200 μ M dNTPs, 200 pmol от всеки праймер, 50 ng ДНК матрица, 1.1mM Mg ацетат, 1.0M GC-Melt и 1 единица Tth ДНК Полимераза в краен обем 50 μ l. Температурния профил на първия цикъл е 94 $^{\circ}$ C за 1 минута, следван от 25 цикъла от 94 $^{\circ}$ C за 30 секунди и 68 $^{\circ}$ C за 2 минути и един цикъл 68 $^{\circ}$ C за 3 минути. PCR продукта с размери 449 нд се подлага на рязане с AраI и KpnI, за да се освободи 254 нд фрагмент, който се изолира чрез електрофореза и се пречиства от гела. Всичките три фрагмента (~ 3.8 Kb, ~ 0.4 Kb и 254 нд) се подлагат на лигазна реакция за свързване на три фрагмента. Продуктът на лигазната реакция се трансформира в компетентни *E.coli* DH5 α клетки. Плазмидната ДНК се изолира от ампицилин резистентните трансформанти и наличието на правилен "insert" се потвърждава от рестриктазния анализ. Този плазмид се означава като pSE238.

pSE238 се подлага на рязане с Eco R1, и е клониран в pWHM3, който е линеализиран с Eco R1 и е трансформиран в клетки на *E.coli* DH5 α . Плазмидната ДНК се изолира от ампицилин резистентните трансформанти и наличието на правилен "insert" се потвърждава от рестриктазния анализ и анализ чрез ДНК секвениране. Плазмидната ДНК се трансформира в *E.coli* DM1, плазмидната ДНК се изолира от

ампицилин резистентните трансформанти и наличието на правилен "insert" се потвърждава от рестриктазния анализ. Плазмидът означен като pSE239 се използва за трансформиране на протопласти на *S. avermitilis* щам SE 180-11. Тиострептон резистентните трансформанти на щам SE 180-11 са изолирани, и се определя наличието на резистентност към еритромицин, и Thio^r Erm^r трансформантите се анализират чрез HPLC анализ на продуктите на ферментацията. Наличието на двойно мутирал *aveC* ген, кодиращ S138T/A139F дава възможност да се възстанови нормалната авермектинова продукция на щам SE 180-11; обаче съотношението между B2 : B1 е 0.75:1, показващо че тази мутация по-нататък редуцира количеството на получения циклохексил-B2 отнесено към количеството на циклохексил-B1 (ТАБЛИЦА 3) още повече от редуциите осигурени от трансформациите с pSE188 или pSE199, pSE231 на щам SE 180-11 с, които са описани по-горе.

ТАБЛИЦА 3

<i>S. avermitilis</i> щам (трансформиран с плазмиди)	Брой на проверените трансформанти	Относит. конц. на B2	Относит. конц. на B1	Средно съотношение B2:B1
SE180-11 (нетрансформиран)	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

Допълнителни мутации са конструирани, които по-нататък да редуцират количеството на циклохексил-B2 отнесено към количеството на циклохексил-B1, чрез използване на техники за ДНК пренасяне, както е описано в Stemmer, 1994, Nature 370:389-391; и Stemmer, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 91:10747-10751; и по-нататък е описано в United States Патенти 5605793, 5811238, 5830721, и 5837458.

ДНК пренасящи плазмиди, носещи мутирани *aveC* гени са трансформирани в компетентни *dam dcm E.coli* клетки. Плазмидната ДНК е изолирана от ампицилин резистентните трансформанти и се използва за трансформиране на протопласти на *S. avermitilis* щам SE 180-11. Тиострептон резистентните трансформанти на щам SE 180-11 са изолирани и скринирани дали съотношението на получените авермектини циклохексил-B2 : циклохексил-B1 е 1:1 или по-малко. Определена е ДНК последователността на плазмидата от трансформантите на SE180-11, продуциращи авермектини със съотношение B2:B1 1:1 или по-малко.

Осем трансформанта, са идентифицирани че продуцират на циклохексил-B1. Най-ниското B2:B1 редуцирани количества на циклохексил-B2 отнесено към количеството съотношение, постигнато измежду тези трансформанти е 0.4:1 (ТАБЛИЦА 4). Плазмидната ДНК е изолирана от всеки от осемте трансформанта и ДНК последователността е определена чрез идентичността на мутациите в *aveC* гена. Мутациите са както следва.

pSE290 съдържа 4 нуклеотидни мутации в нуклеотиден тип позиция 317 в който е станала промяна от Т в А, в нуклеотиден тип позиция 353 в която е станала промяна от С в А, в нуклеотиден тип позиция 438 в която е станала промяна от G в А и в нуклеотиден тип позиция 1155, в която е станала промяна от Т в А. Нуклеотидните

промени в нуклеотиден тип позиция 317, променят аминокиселината в АК позиция 48 от D в E и нуклеотидните промени в нуклеотидния тип позиция 438, променя АК позиция 89 от A в T. Съотношението B2:B1 получено от клетки, носещи този плазмид е 0.42:1 (ТАБЛИЦА 4).

pSE291 съдържа 4 нуклеотидни мутации в нуклеотиден тип позиция 272 в който е станала промяна от G в A, в нуклеотиден тип позиция 585 в която е станала промяна от T в A, в нуклеотиден тип позиция 588 в която е станала промяна от G в A и в нуклеотиден тип позиция 708, в която е станала промяна от G в A. Нуклеотидните промени в нуклеотиден тип позиция 585, променят аминокиселината в АК позиция 138 от S в T и нуклеотидните промени в нуклеотидния тип позиция 588, променя АК позиция 139 от A в T и нуклеотидните промени в нуклеотиден тип позиция 708, променя АК позиция 179 от G в S. Съотношението B2:B1 получено от клетки, носещи този плазмид е 0.57:1 (ТАБЛИЦА 4).

pSE292 съдържа същите четири нуклеотидни мутации, като pSE290. Съотношението B2:B1 получени от клетки, носещи този плазмид е 0.40:1 (ТАБЛИЦА 4).

pSE293 съдържа 6 нуклеотидни мутации в нуклеотиден тип позиция 24 в който е станала промяна от A в G, в нуклеотиден тип позиция 580, в която е станала промяна от T в C, в тип позиция 282 в която е станала промяна от A в C, в нуклеотиден тип позиция 497 в която е станала промяна от C в T, в нуклеотиден нуклеотиден тип позиция 886, в която е станала промяна от A в T. Нуклеотидните промени в нуклеотиден тип позиция 286, променят аминокиселината в АК промяна от T в C, в нуклеотиден тип позиция 554, в която е станала позиция 38 от Q в P и нуклеотидните промени в нуклеотидния тип позиция 580, променя АК позиция 136 от L в P и нуклеотидните промени в нуклеотиден тип позиция 886, променя АК позиция 238 от E

в D. Съотношението B2:B1 получени от клетки, носещи този плазмид е 0.68:1 (ТАБЛИЦА 4).

pSE294 съдържа 6 нуклеотидни мутации в нуклеотиден тип позиция 469 в който е станала промяна от Т в С, в нуклеотиден тип позиция 585 в която е станала промяна от Т в А, в нуклеотиден тип позиция 588 в която е станала промяна от G в А, в нуклеотиден тип позиция 708, в която е станала промяна от G в А, в нуклеотиден тип позиция 833, в която е станала промяна от С в Т, в нуклеотиден тип позиция 469, променят позиция 1184, в която е станала промяна от G в А. Нуклеотидните промени аминокиселината в АК позиция 99 от F в S и нуклеотидните промени в нуклеотидния тип позиция 585, променя АК 588, променя АК позиция 139 от А в Т и нуклеотидните промени позиция 138 от S в Т и нуклеотидните промени в нуклеотиден тип позиция в нуклеотиден тип позиция 708, променя АК позиция 179 от G в S. Съотношението B2:B1 получени от клетки, носещи този плазмид е 0.53:1 (ТАБЛИЦА 4).

pSE295 съдържа 2 нуклеотидни мутации в нуклеотиден тип позиция 588 в който е станала промяна от G в А и в нуклеотиден тип позиция 856 в която е станала промяна от Т в С. Нуклеотидните промени в нуклеотиден тип позиция 588, променят аминокиселината в АК позиция 139 от А в Т и нуклеотидните промени в нуклеотидния тип позиция 856, променя АК позиция 228 от М в Т. Съотношението B2:B1 получени от клетки, носещи този плазмид е 0.80:1 (ТАБЛИЦА 4).

pSE296 съдържа 5 нуклеотидни мутации в нуклеотиден тип позиция 155 в който е станала промяна от Т в С, в нуклеотиден тип позиция 505 в която е станала промяна от G в Т, в нуклеотиден тип позиция 1039 в която е станала промяна от С в Т, в нуклеотиден тип позиция 1202, в която е станала промяна от С в Т, в нуклеотиден тип позиция 1210, в която е станала промяна от Т в С. Нуклеотидните

промени в нуклеотиден тип позиция 505, променят аминокиселината в АК позиция 111 от G в V и нуклеотидните промени в нуклеотидния тип позиция 1039, променя АК позиция 289 от P в L. Съотношението B2:B1 получени от клетки, носещи този плазмид е 0.73:1 (ТАБЛИЦА 4).

pSE297 съдържа 4 нуклеотидни мутации в нуклеотиден тип позиция 377 в който е станала промяна от G в T, в нуклеотиден тип позиция 588 в която е станала промяна от G в A, в нуклеотиден тип позиция 633 в която е станала промяна от A в G, в нуклеотиден тип позиция 1067, в която е станала промяна от A в T. Нуклеотидните промени в нуклеотиден тип позиция 588, променя АК позиция 139 от A в T, нуклеотидните промени в нуклеотиден тип позиция 633, променя АК позиция 154 от K в E и нуклеотидните промени в нуклеотиден тип позиция 1067, променя АК позиция 298 от Q в H. Съотношението B2:B1 получени от клетки, носещи този плазмид е 0.67:1 (ТАБЛИЦА 4).

ТАБЛИЦА 4

<i>S. avermitilis</i> щам (трансформиран с плазмиди)	Брой на проверените трансформанти	Относит. конц. на B2	Относит. конц. на B1	Средно съотношение B2:B1
SE180-11 (нетрансформиран)	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. ПРИМЕР ЗА ИЗПЪЛНЕНИЕ НА ИЗОБРЕТЕНИЕТО:
КОНСТРУИРАНЕ НА 5' ДЕЛЕЦИОННИ МУТАНТИ

Както е обяснено в Глава 5.1, по-горе нуклеотидните последователности на *S. avermitilis*, показани на ФИГУРА 1 (SEQ ID NO: 1) включват 4 различни GTG кодона в позиции на нд 42, 174, 177 и 180, които са потенциални стартови места. Тази глава описва конструирането на много делеции в 5' района на ORF на aveC (ФИГУРА 1, SEQ ID NO: 1) за да се подпомогне определянето кои от тези кодони биха могли да функционират като стартови места на ORF на aveC за експресия на белтък.

Фрагменти, изрязани по различен начин от 5' района на aveC гена са изолирани от хромозомната ДНК на *S. avermitilis* чрез PCR амплификация. PCR праймерите са изготвени на базата на ДНК последователността на aveC гена и са доставени от Genosys Biotechnologies, Inc. Праймерите за четене отляво на ляво (5'-3') са: 5'-AACCCATCCGAGCCGCTC-3' (SEQ ID NO:16) (D1F1); 5'-TCGGCCTGCCAACGAAC-3' (SEQ ID NO:17) (D1F2); 5'-CCAACGAACGTGTAGTAG-3' (SEQ ID NO:18) (D1F3); и 5'-TGCAGGCGTACGTGTTTCAGC-3' (SEQ ID NO:19) (D2F2). Праймерите за четене отляво на дясно (3'-5') са 5'-CATGATCGCTGAACCGA-3' (SEQ ID NO:20), 5'-CATGATCGCTGAACCGAGGA-3' (SEQ ID NO:21) и 5'-AGGAGTGTGGTGCGTCTGGA-3' (SEQ ID NO:22). PCR реакцията се осъществява както е описано в Глава 8.3 по-горе.

PCR продуктите се разделят в 1% агарозен гел и се установяват единичните ДНК ивици, отговарящи на размери ~ 1.0 Kb или ~ 1.1 Kb. PCR продуктите се изолират от гела и се подлагат на лигазна реакция с 25 ng от линеализиран pCR2.1 вектор (Invitrogen), като моларното съотношение вектор : "insert" е 1:10, следвайки инструкциите на производителя. Лигазната смес се използва за трансформиране на One Shot™ *E. coli* компетентни клетки (Invitrogen), следвайки инструкциите на производителя. Плазмидната ДНК се изолира от ампицилин резистентните трансформанти и наличието на "insert" се потвърждава, чрез рестриктазен анализ и анализ чрез ДНК секвениране. Тези плазмиди се означават като pSE190 (получени с праймер D1F1), pSE191 (получени с праймер D1F2), pSE192 (получени с праймер D1F3) и pSE193 (получени с праймер D2F2).

Всички ДНК "insert"-и се подлагат на рестриктазно рязане с BamH1/XbaI, разделят се електрофоретично, пречистват се от гела и се подлагат на лигазни реакции поотделно с "shuttle" вектора pWHM3, който е линеализиран с BamH1/XbaI, като концентрацията на цялото количество ДНК за една реакция е 1 μ g, а моларното съотношение вектор : "insert" е 1:5. Продуктите от лигазните реакции се използват за трансформиране на компетентни клетки на *E. coli* DH5 α и наличието на "insert" се потвърждава, чрез рестриктазен анализ. Тези плазмиди означени като pSE194 (D1F1), pSE195 (D1F2), pSE196 (D1F3) и pSE197 (D2F2) се трансформират поотделно в *E. coli* DM1, плазмидната ДНК се изолира от ампицилин резистентните трансформанти и наличието на правилен "insert" се потвърждава чрез рестриктазен анализ. Тази ДНК се използва за трансформиране на протопласти на *S. avermitilis* шам SE 180-11. Тиострептон резистентните трансформанти на шам SE 180-11 са изолирани, и се определя наличието на резистентност към еритромицин, и Thio^r Erm^r трансформантите се анализират чрез HPLC анализ на

продуктите на ферментацията, с цел определяне кои от GTG местата са необходими за експресията на *aveC*. Резултатите показват, че GTG кодона в позиция 42 може да бъде елиминиран без това да се отрази на експресията на *aveC*, докато pSE194, pSE195 и pSE196, във всеки от който липсва GTG място в позиция 42, но който съдържа останалите три GTG места в позиции 174, 177 и 180, са способни да възстановят нормалната авермектинова продукция, когато са трансформирани в SE 180-11. Нормалната авермектинова продукция не се възстановява, когато шам шам SE 180-11 е трансформиран с pSE197, в който липсват всичките 4 GTG места (ТАБЛИЦА 5).

ТАБЛИЦА 5

<i>S. avermitilis</i> шам (трансформиран с плазмиди)	Брой на проверените трансформанти	Относит. конц. на B2	Относит. конц. на B1	Средно съотнош. B2:B1
SE180-11 (нетрансформиран)	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)	12	0	0	0

10 ПРИМЕР ЗА ИЗПЪЛНЕНИЕ НА ИЗОБРЕТЕНИЕТО:**КЛОНИРАНЕ НА aveC ХОМОЛОЗИ ОТ
S.HYGROSCOPICUS И S.GRISEOCHROMOGENES**

Настоящото изобретение позволява да бъдат идентифицирани и клонирани хомолози на aveC гена от други авермектин- или милбемицин- продуциращи видове на *Streptomyces*. Например, козмидна библиотека на геномната ДНК на *S.hygroscopicus* (FERM BP-1901) може да хибридира с 1.2 Kb aveC сонда от *S.avermitilis* описана по-горе. Идентифицирани са няколко козмидни клона, които притежават висока степен на хибридизация. Хромозомната ДНК е изолирана от тези козмиди и 4.9 Kb KpnI фрагмент е идентифициран, чрез хибридизация с aveC сондата. Тази ДНК е секвенирана и е идентифицирана ORF на aveC (SEQ ID NO:3), която има значителна хомология с ORF на aveC на *S.avermitilis*. Аминокиселинна последователност (SEQ ID NO:4) производна на хомолога на ORF на aveC на *S.hygroscopicus*, представена на ФИГУРА 6.

В допълнение, козмидна библиотека на геномната ДНК на *S.griseochromogenes* хибридира с 1.2 Kb aveC сонда от *S.avermitilis* описана по-горе. Идентифицирани са няколко козмидни клона, които притежават висока степен на хибридизация. Хромозомната ДНК е изолирана от тези козмиди и 5.4 Kb PstI фрагмент е идентифициран, чрез хибридизация с aveC сондата. Тази ДНК е секвенирана и е идентифициран частичен хомолог на ORF на aveC, който има значителна хомология с ORF на aveC на *S.avermitilis*. Производната аминокиселинна секвенция (SEQ ID NO:5) е представена на ФИГУРА 6.

Анализ на ДНК и аминокиселинните последователности на aveC хомолозите от *S.hygroscopicus* и *S.griseochromogenes* показва, че тези райони притежават значителна хомоложност (~ 50 % идентичност

на аминокиселините последователности) както един спрямо друг, така и със ORF на AveC генния продукт на *S. avermitilis* (ФИГУРА 6).

11. ПРИМЕР ЗА ИЗПЪЛНЕНИЕ НА ИЗОБРЕТЕНИЕТО:

КОНСТРУИРАНЕ НА ПЛАЗМИД С aveC ГЕН.

РАЗПОЛОЖЕН ЗАД ermE ПРОМОТОРА

ORF на aveC с големина 1.2 Kb от pSE186 е субклонирен в pSE34, който е "shuttle" векторът pWHM3, който притежава ermE промотора, с големина 300 нд, въведен като KpnI/BamHI фрагмент в KpnI/BamHI мястото на pWHM3 (виж Ward et al., 1986, Mol.Gen.Genet.203:468-478). pSE186 се подлага на рестриктазно рязане с Bam HI и Hind III, продукта на рязането се разделя електрофоретично и 1.2 Kb фрагмент се изолира от агарозния гел и се подлага на лигазна реакция с pSE34, който е линеализиран с Bam HI и Hind III. Лигазната смес се трансформира в компетентни *E.coli* DH5 α клетки, съгласно с инструкциите на трансформанти и наличието на 1.2 Kb "insert" се потвърждава производителя. Плазмидната ДНК се изолира от ампицилин резистентните чрез рестриктазен анализ. Плазмидът, означен като pSE189 който е подложен на рестриктазно рязане се трансформира в *E.coli* DM1 и плазмидната ДНК се изолира от ампицилин резистентните трансформанти. Протопласти на *S. avermitilis* шам 1100-SC38 се трансформират с pSE189. Тиострептон резистентните трансформанти на шам 1100-SC38 са изолирани и анализирани чрез HPLC анализ на продуктите на ферментацията.

Трансформантите на *S. avermitilis* 1100-SC38 шам съдържащи pSE189 се характеризират с това, че получените авермектини имат променено съотношение циклохексил-B2: авермектин циклохексил-B1 (около 1:3) в сравнение със шам 1100-SC38 (около 34:1) и като цяло

авермектиновата продукция се повишава около 2.4 пъти, в сравнение със шам 1100-SC38, трансформиран с pSE119 (ТАБЛИЦА 6).

pSE189 е трансформиран също в протопласти на шам на див тип *S. avermitilis*. Тиострептон резистентните трансформанти са изолирани и анализирани чрез HPLC анализ на продуктите на ферментацията. Като цяло авермектиновата продукция от дивия тип *S. avermitilis*, трансформиран с pSE189 се повишава около 2.2 пъти, в сравнение с дивия тип *S. avermitilis*, трансформиран с pSE119 (ТАБЛИЦА 6).

ТАБЛИЦА 6

<i>S. avermitilis</i> шам (трансфор- миран с плазмиди)	Брой на проверените трансфор- манти	Относит. [B2]	Относит. [B1]	Относит. количество на аверме- ктините	Средно съотнош. 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	564	166	849	3.3
Див тип	6	59	42	113	1.41
Див тип (pSE119)	6	248	151	481	1.64
Див тип (pSE189)	5	545	345	1.071	1.58

12. ПРИМЕР ЗА ИЗПЪЛНЕНИЕ НА ИЗОБРЕТЕНИЕТО:

ХИМЕРЕН ПЛАЗМИД, СЪДЪРЖАЩ ПОСЛЕДОВАТЕЛНОСТИ ОТ ORF НА aveC НА S.AVERMITILIS И ОТ aveC ХОМОЛОГА НА S.HYGROSCOPICUS

Конструиран е хибриден плазмид, означаван като pSE350, който носи участъка от 564 нд на aveC хомолога на *S.hygroscopicus* вместо 564 нд от хомоложния участък на ORF на aveC на *S.avermitlis* (ФИГУРА 7), както следва. pSE350 е конструиран, като е използвано рестриктазното място BsaAI (aveC в позиция 225), което е консервативно и за двете последователности и KpnI рестриктазното място (aveC в позиция 810), което присъства в aveC гена на *S.avermitlis*. KpnI мястото е въведено в ДНК на *S.hygroscopicus* чрез PCR, чрез използване на праймера за четене отясно на ляво (5'-3'): 5'-СТTCAGGTGTACGTGTTCG -3' (SEQ ID NO:23); и праймера за четене отляво на дясно (3'-5') : 5'-GAACTGGTACCAGTGCCC-3' (SEQ ID NO:24) (доставени от Genosys Biotechnologies), при PCR условията, описани в Глава 7.1.10, по-горе. PCR продукта, се подлага на рязане с BsaAI и KpnI, фрагментите се разделят електрофоретично в 1% агарозен гел и фрагментът BsaAI/KpnI с големина 564 нд се изолира от гела. Плазмидът pSE179 (описан в Глава 7.1.10 по-горе) се отваря с KpnI и Hind III, и фрагментите се разделят чрез електрофореза в 1% агарозен гел, и фрагментът с размери ~ 4.5 Kb се изолира от гела. pSE179 се линеализира с Hind III и BsaAI, фрагментите се разделят чрез електрофореза в 1% агарозен гел и BsaAI/Hind III фрагмента с размери ~ 0.2 Kb се изолира от гела. Фрагмента HindIII/KpnI с размери ~ 4.5 Kb, фрагмента BsaAI/Hind III с размери ~ 0.2 Kb и фрагмента BsaAI/KpnI с размери 564 нд от *S.hygroscopicus* се подлагат заедно на лигазна реакция за свързване на 3 фрагмента и продуктът на лигазната реакция се трансформира в компетентни клетки на *E.coli* DH5α. Плазмидната ДНК

се изолира от ампицилин резистентните трансформанти и наличието на правилен "insert" се потвърждава чрез рестриктазен анализ с KpnI и AvaI. Този плазмид се подлага на рестриктазно рязане с Hind III и XbaI за да се получи 1.2 Kb "insert", който след това се свързва чрез лигазна реакция с pWHM3, който е линеализиран с Hind III и XbaI. Лигазната смес се трансформира в компетентни клетки на *E.coli* DH5 α , плазмидната ДНК се изолира от ампицилин резистентните трансформанти и наличието на правилен "insert" се потвърждава чрез рестриктазен анализ с Hind III и AvaI. Тази плазмидна ДНК се трансформира в *E.coli* DM1, плазмидната ДНК се изолира от ампицилин резистентните трансформанти и наличието на правилен "insert" се потвърждава чрез рестриктазен анализ и анализ чрез ДНК секвениране.. Този плазмид се означава, като pSE350 и се използва за трансформация на протопласти на *S. avermitilis* шам SE180-11. Тиострептон резистентните трансформанти на шам SE180-11 са изолирани и се определя наличието на резистентност към еритромицин, и Thio^r и Egm^r трансформантите се анализират чрез HPLC анализ на продуктите на ферментацията. Резултатите показват, че трансформантите носят хибриден плазмид на *S. avermitilis*/*S. hygroscopicus*, който има средно съотношение на B2:B1 около 109:1 (ТАБЛИЦА 7).

ТАБЛИЦА 7

<i>S. avermitilis</i> шам (трансформиран с плаزمиди)	Брой на проверените трансформанти	Относит. конц. на B2	Относит. конц. на B1	Средно съотнош. B2:B1
SE180-11 (нетрансформиран)	8	0	0	0
SE180-11 (pWHM3)	8	0	0	0
SE180-11 (pSE350)	16	233	2	109

09.10.03

ДЕПОЗИРАНЕ НА БИОЛОГИЧНИТЕ МАТЕРИАЛИ

Следните биологични материали са депозирани в American Type Culture Collection (ATCC), 12301 Parklawn Drive, Rockville, MD, 20852, USA на 29^{-ти} Януари, 1998 и имат следните номера за достъп:

<u>Плазмид</u>	<u>Номер за Достъп:</u>
плазмид pSE180	209605
плазмид pSE186	209604

Всички патенти, патентни приложения, и публикации цитирани по-горе са изцяло въведени тук в литературната справка.

Настоящото изобретение не се ограничава в обхвата на специфичните варианти, описани тук, които са с цел илюстриране на индивидуалните аспекти на изобретението и на функционално еквивалентните методи и компоненти, които са в обхвата на изобретението. Действително, разнообразните модификации на изобретението, в допълнение на тези показани и описани тук ще станат очевидни на специалистите в областта от предшестващите описания и придружаващите ги илюстрации. Тези модификации имат за цел да попаднат в обхвата на приложените патентни претенции.

НОВИ ПАТЕНТНИ ПРЕТЕНЦИИ:

1. Полинуклеотидна молекула, включваща нуклеотидна последователност на aveC алела на *Streptomyces avermitilis* или последователност на плазмид pSE186 (ATCC 209604), кодираща AveC генен продукт или нуклеотидна последователност на ORF на aveC на *S. avermitilis*, която е представена на ФИГУРА 1 (SEQ ID NO:1), или изроден неин вариант, но която по-нататък включва най-малко първа мутация, кодираща аминокиселинно заместване на серин с треонин на аминокиселинен остатък на AveC генния продукт, отговарящ на аминокиселинна позиция 138 от SEQ ID NO:2 и втора мутация, кодираща аминокиселинно заместване на аланин с фенилаланин на аминокиселинен остатък на AveC генния продукт, отговарящ на аминокиселинна позиция 139 от SEQ ID NO: 2, като тези клетки на *S. avermitilis* щам ATCC 53692, в които дивият тип aveC алел е инактивиран и които експресират полинуклеотидна молекула, включваща мутиралата нуклеотидна последователност, продуцират авермектини със съотношение клас 2:1, което е редуцирано, в сравнение със съотношението клас 2:1 на авермектини, продуцирани от клетки на *S. avermitilis* щам ATCC 53692, които вместо това експресират само див тип aveC алел.

2. Полинуклеотидна молекула съгласно претенция 1, където авермектини клас 2:1 са авермектини циклохексил B2 : циклохексил B1.

3. Полинуклеотидна молекула съгласно претенция 2, където редуцираното съотношение циклохексил B2 : циклохексил B1 е 0.75 : 1 или по-малко.

4. Рекомбинантен вектор, включващ полинуклеотидна молекула съгласно претенция 1.

5. Рекомбинантен вектор, способен да доведе до мутурал aveC алел на *Streptomyces avermitilis*, чрез въвеждане най-малко на първа

мутация, кодираща аминокиселинно заместване на серин с треонин в аминокиселинен остатък на AveC генния продукт, отговарящ на аминокиселинна позиция 138 от SEQ ID NO:2 и втора мутация, кодираща аминокиселинно заместване на аланин с фенилаланин на аминокиселинен остатък на AveC генния продукт, отговарящ на аминокиселинна позиция 139 от SEQ ID NO: 2, включващ полинуклеотидна молекула, която има нуклеотидна последователност, кодираща такава мутация.

6. Рекомбинантен вектор, съгласно претенция 5, включващ полинуклеотидна молекула, съгласно претенция 1

7. Клетка гостоприемник на *Streptomyces*, включваща полинуклеотидна молекула съгласно претенция 1 или рекомбинантен вектор, съгласно претенция 4 или 5.

8. Метод за създаване на нов щам на *Streptomyces avermitilis*, включващ клетки, които експресират мутирал aveC алел и продуцират авермектини с редуцирано съотношение клас 2:1, в сравнение с клетки на същия щам на *S. avermitilis*, които вместо това експресират само див тип aveC алел, характеризиращ се с това, че включва: (а) въвеждане на полинуклеотидна молекула в клетка на *S. avermitilis* щам, която полинуклеотидна молекула носи мутирал aveC алел или изроден негов вариант, който кодира AveC генен продукт, характеризиращ се с това, че включва най-малко първо аминокиселинно заместване на серин с треонин на аминокиселинен остатък, отговарящ на аминокиселинна позиция 138 от SEQ ID NO:2 и втора мутация, кодираща аминокиселинно заместване на аланин с фенилаланин на аминокиселинен остатък, отговарящ на аминокиселинна позиция 139 от SEQ ID NO: 2, където експресията на споменатия генен продукт води до редукция на съотношението клас 2:1 на авермектини, получени от клетки на *S. avermitilis* щам, експресиращи мутирал aveC алел или изроден негов вариант, в сравнение с клетки на същия щам, които

вместо това експресират само див тип aveC алел и селекция на клетки, които продуцират авермектини с редуцирано съотношение клас 2:1, в сравнение със съотношението клас 2:1 на авермектините, получени от клетки на същия шам, които вместо това експресират само дивия тип aveC алел, или (б) въвеждане на една или повече полинуклеотидни молекули в клетка на *S. avermitilis* шам, които полинуклеотидни молекули са способни да въведат една или повече мутации в aveC алела, така че тези клетки, кодират AveC генен продукт, който има най-малко първо аминокиселинно заместване на серин с треонин на аминокиселинен остатък, отговарящ на аминокиселинна позиция 138 от SEQ ID NO:2 и второ аминокиселинно заместване на аланин с фенилаланин на аминокиселинен остатък, отговарящ на аминокиселинна позиция 139 от SEQ ID NO: 2, където експресията на получения генен продукт, води до редукция на съотношението клас 2:1 на авермектини, получени от клетки на *S. avermitilis* шам, експресиращи мутирал aveC алел, в сравнение с клетки на същия шам, които вместо това експресират само див тип aveC алел и селекция на клетки, които продуцират авермектини с редуцирано съотношение клас 2:1, в сравнение със съотношението клас 2:1 на авермектини получени от клетки на шам, които вместо това експресират само див тип aveC алел.

9. Метод, съгласно претенция 8, характеризираш се с това, че авермектини клас 2:1 са авермектини циклохексил B2 : циклохексил B1.

10. Метод, съгласно претенция 9, характеризираш се с това, че редуцираното съотношение циклохексил B2 : циклохексил B1 е 0.75 : 1 или по-малко.

11. Клетка на *Streptomyces avermitilis*, включваща мутирал aveC алел, включващ първа мутация, кодираща аминокиселинно заместване на серин с треонин на аминокиселинен остатък, отговарящ на аминокиселинна позиция 138 от SEQ ID NO:2 и втора мутация, кодираща аминокиселинно заместване на аланин с фенилаланин на

05.03.02

аминокиселинен остатък, отговарящ на аминокиселинна позиция 139 от SEQ ID NO: 2.

12. Клетка, съгласно претенция 11, която продуцира авермектини в редуцирано съотношение клас 2:1, в сравнение с клетка от същия шам на *Streptomyces avermitilis*, която вместо това включва само дивия тип aveC алел.

13. Клетка, съгласно претенция 12, където авермектините клас 2:1 са циклохексил B2 : циклохексил B1.

14. Клетка съгласно претенция 13, където редуцираното съотношение циклохексил B2:циклохексил B1 е 0.75:1 или по-малко.

15. Метод за получаване на авермектини, характеризиращ се с това че включва култивиране на клетки, съгласно претенция 11, в среда за култивиране, при условия, които позволяват или индуцират продукцията на авермектини от тях и повторно получаване на споменатите авермектини от културата.

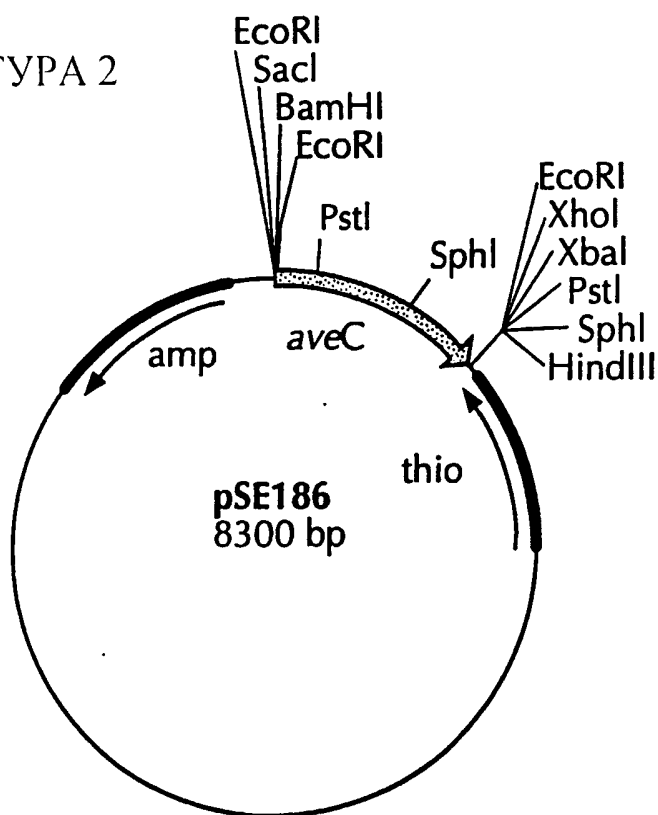
16. Състав на авермектини циклохексил B2:циклохексил B1, получени от клетки на *Streptomyces avermitilis*, характеризиращ се с това че включва авермектините със съотношение циклохексил B2 : циклохексил B1, което е 0.75:1 или по-малко, в среда в която са култивирани клетките.

17. Състав на авермектини циклохексил B2:циклохексил B1, получени от клетки на *Streptomyces avermitilis* шам, които експресират мутирал aveC алел, който кодира генен продукт, който води до съотношение клас 2:1 на авермектини циклохексил B2 : циклохексил B1, получени от клетки, в сравнение с клетки на същия шам на *S. avermitilis*, които не експресират мутирал aveC алел, но които вместо това експресират само дивия тип aveC алел, който състав се характеризира с това, че включва авермектини циклохексил B2:циклохексил B1 със съотношение около 0.75:1 или по-малко, които присъстват в средата, в която са култивирани клетките.

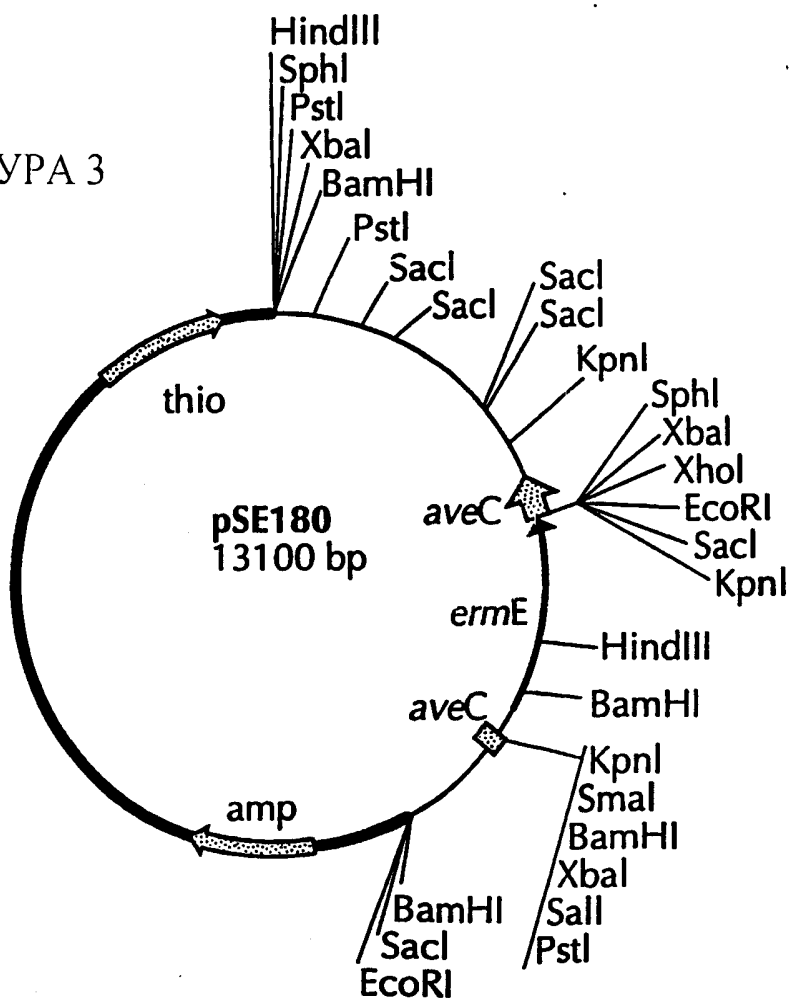
05.03.02

2 / 7

ФИГУРА 2

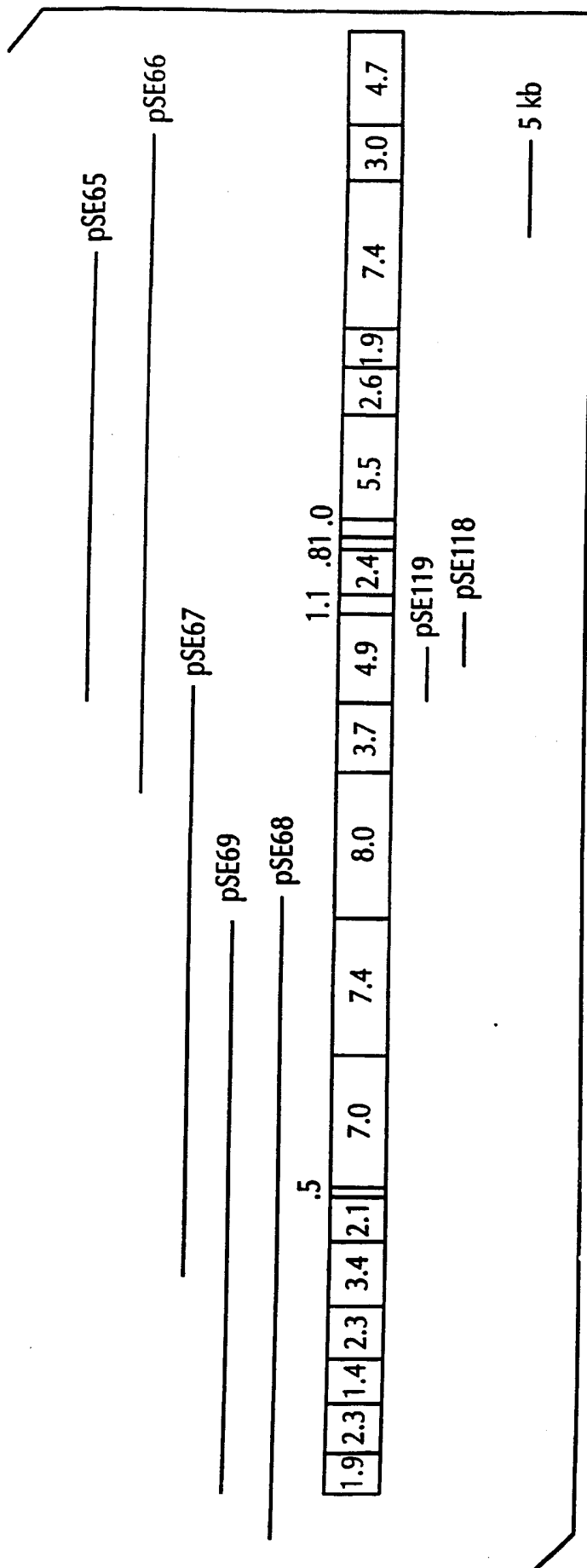


ФИГУРА 3



09.03.00

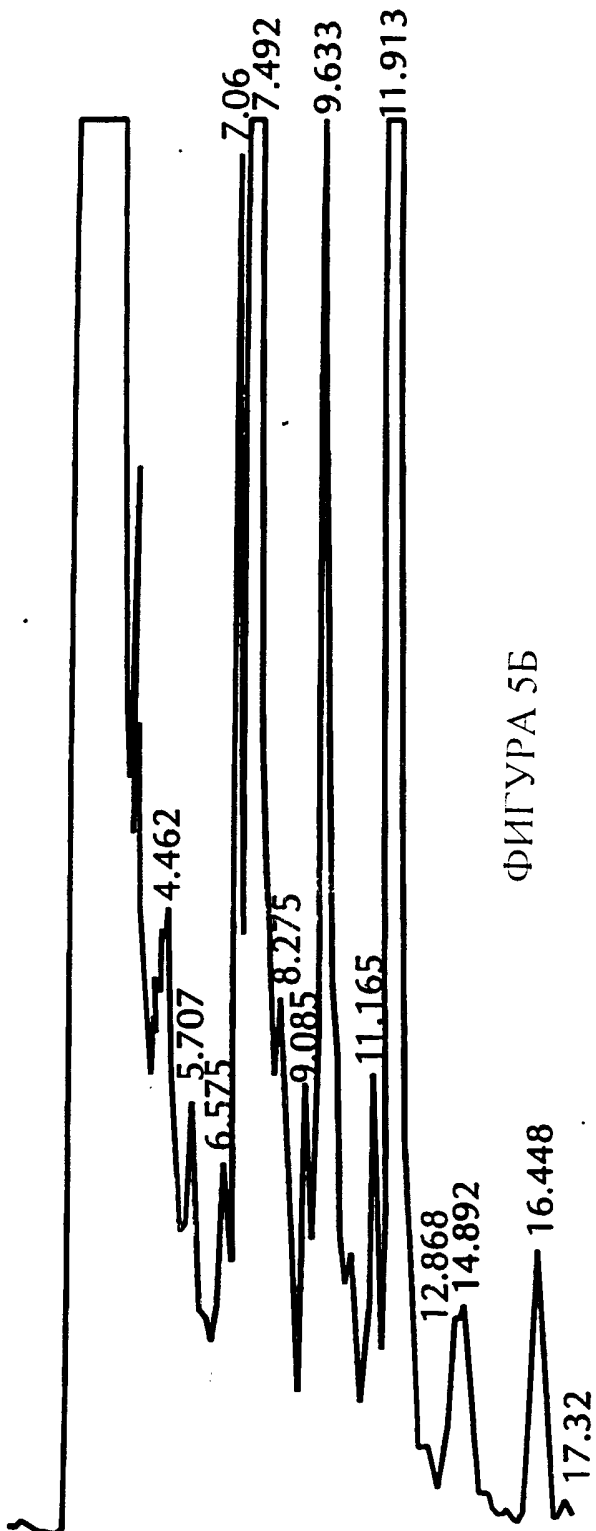
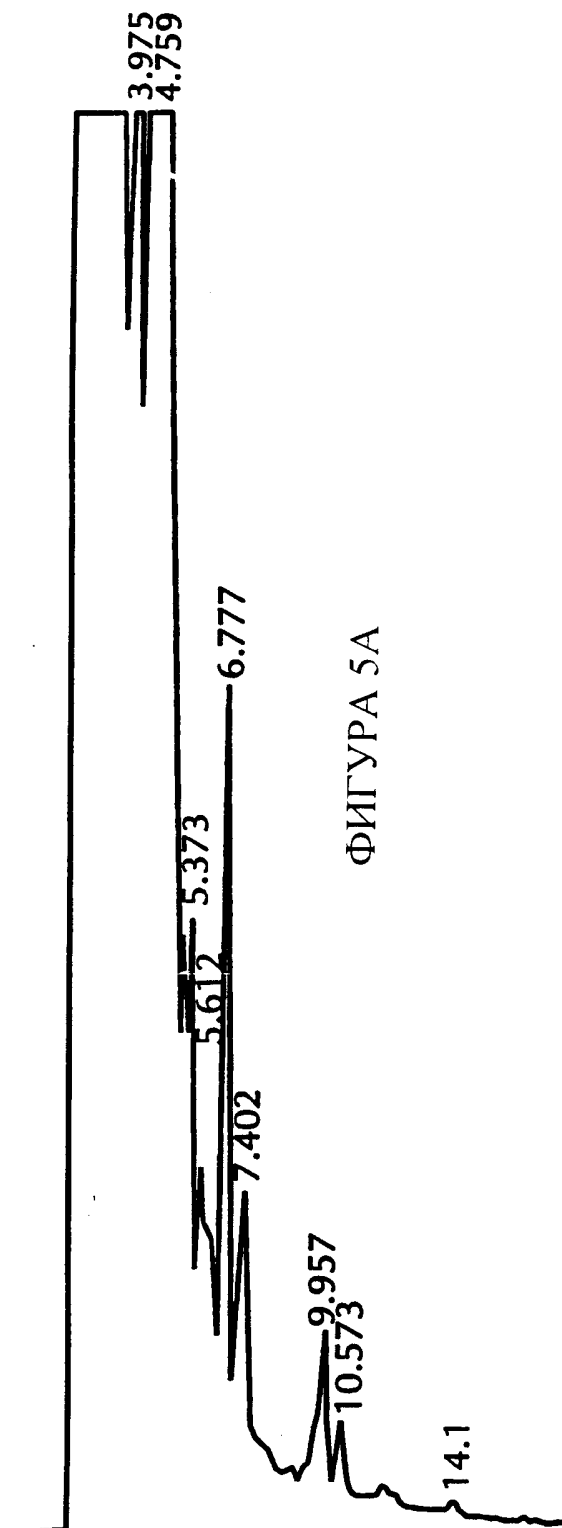
3/7



ФИГУРА 4

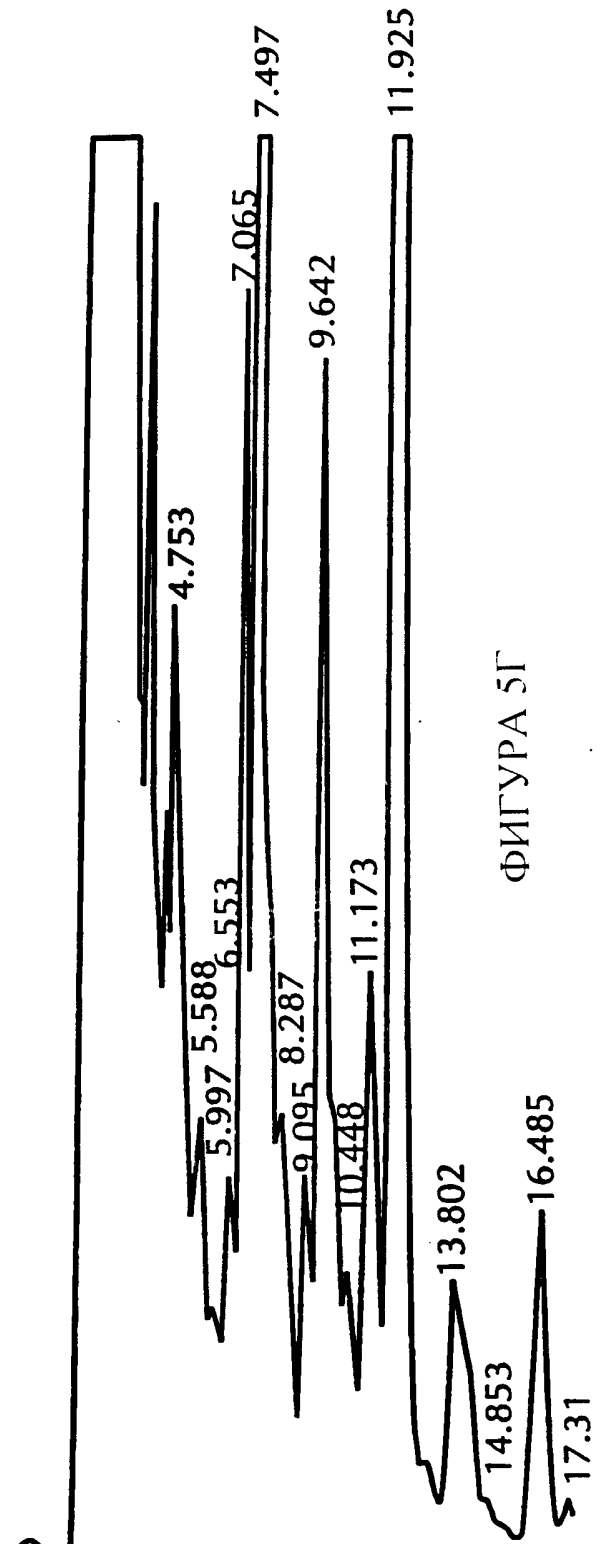
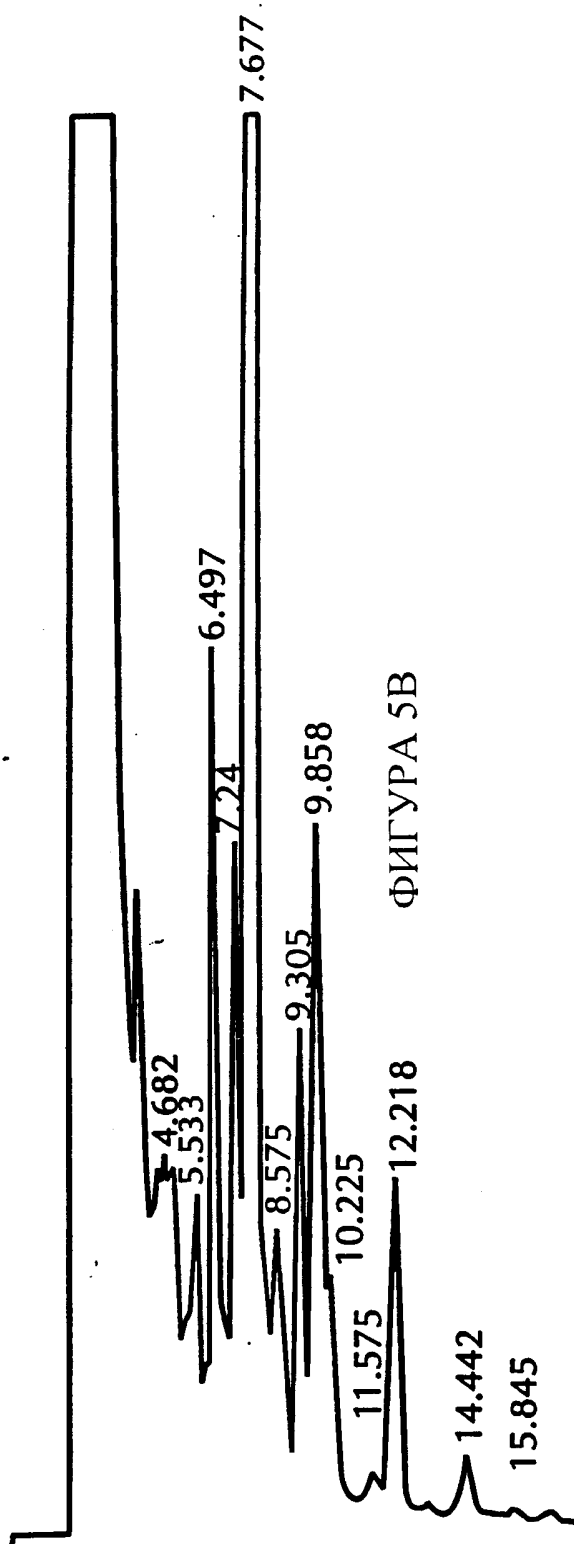
05.03.02

4/7



03.03.00

5/7



05.03.02

6/7

ФИГУРА 6

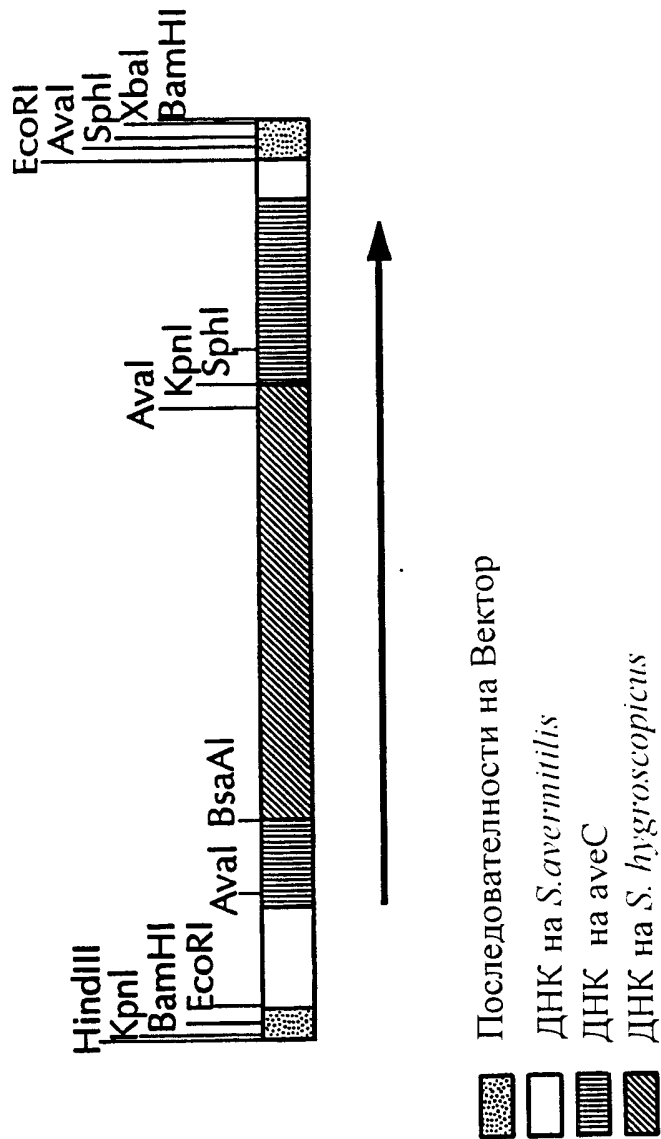
S. ave
S. gri
S. hyg
Cons

.....
.....
VFTLP

	1		50
S. ave	VVVWAGVGLL FLALQAYVFS RWAADGGYRL IETAGQGQGG SKDTGTTDVV		
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 AAAAWLFRRRC RVERRLLFDA LLFLGLLFAS WQSPLMNWFH		
S. gri	LPALSMAGVV GLAFWLVRRW RAERRLSFDA LLFTGVLFAG WLSPLMNWFH		
S. hyg	IPLLSVVGAV VLAVCLYRRC RARRRLTFDA SLFIGLLSAS WQSPLMNWIN		
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	PVLASNVMVF GAVASWGPYV PGWQGAGAHQ EAELPLATLS ICMTAMMAAV		
Cons	pVL-sN--Vw GAVgSWGPYV PGWqGagpg- EAElPLat-S -cmtal---v		
	151		200
S. ave	LCSKALGWIW ARRPAWRTWR LVLAVFFIGI 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 SIALYTGANG AHILFSLMDG APPDRLPEFF		
Cons	lp-----w-r -lavvgg-n- ---lyt---- -hil-sl--g -ppd-lp--f		
	301		
S. ave	QAPAAAY*		
S. gri	~~~~~		
S. hyg	RPAAGY*		
Cons	---a-y		

05.03.00

7/7



ФИГУРА 7

05.03.00

SEQUENCE LISTING

<110> PFIZER PRODUCTS INC.

<120> ГЕН НА *STREPTOMYCES AVERMITILIS*, МОДУЛИРАЩ СЪОТНОШЕНИЕТО
НА АВЕРМЕКТИНИТЕ В2:В1

<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

tccggcctgcc caacgaacgt gtagtagaca cccgaccgtc ccatgccacg ctctcaccgc 120

aggccggcct gaacaggtca ggagcgtgc 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

05.05.02

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 ggc 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 ggc ctg gtc	848
Glu Trp Tyr Gln Phe Pro Val Tyr Gln Ala Val Gly Ser Gly Leu Val	
210 215 220 225	

05.03.02

tgc tgc atg ctg ggc tgc 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 cgggctcctc 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

05.03.02

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

05.03.02

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

05.03.02

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 tcggtcacc tgtggcgcc				1080
catgcggtga gcgctccgcc tcgtccttgt tccggctcct gggtccacg 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]

<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

05.03.02

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

05.03.02

<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 gactcccctt 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
gggggcgggc ccgggtgcgg aggcggaaat gccctggcg acg 43

<210> 13
<211> 20

05.03.02

<212> DNA

<213> Streptomyces avermitilis

<400> 13

ggaaccgacc gcctgatata

20

<210> 14

<211> 46

<212> DNA

<213> Streptomyces avermitilis

<400> 14

gggggagggc 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

05.03.02

<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

cttcagggtg acgtgttcg

19

05.03.02

<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