



ФЕДЕРАЛЬНАЯ СЛУЖБА
ПО ИНТЕЛЛЕКТУАЛЬНОЙ СОБСТВЕННОСТИ,
ПАТЕНТАМ И ТОВАРНЫМ ЗНАКАМ

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ПАТЕНТУ

(21), (22) Заявка: 2004124521/13, 31.01.2003

(24) Дата начала отсчета срока действия патента:
31.01.2003

(30) Конвенционный приоритет:
12.02.2002 (пп.1-17) US 60/356,222

(43) Дата публикации заявки: 10.04.2005

(45) Опубликовано: 10.02.2007 Бюл. № 4

(56) Список документов, цитированных в отчете о
поиске: WO 0112821 A1, 22.02.2001. WO 9941389
A1, 19.08.1999. RU 98110940 A, 20.07.2000.

(85) Дата перевода заявки РСТ на национальную фазу:
11.08.2004

(86) Заявка РСТ:
IB 03/00348 (31.01.2003)

(87) Публикация РСТ:
WO 03/068955 (21.08.2003)

Адрес для переписки:
129010, Москва, ул. Б.Спасская, 25, стр.3,
ООО "Юридическая фирма Городисский и
Партнеры", пат.пов. Е.Е.Назиной, рег. № 517

(72) Автор(ы):

ШТУТЦМАН-ЭНГВАЛЛЬ Ким Джонелл (US),
ГУСТАФССОН Клаэс Эрик Даниэль (US),
КРЕББЕР Анке (US),
РАЙЛЛАРД Сун Ай (US),
МИНШУЛЛ Джереми Стивен (US),
КИМ Серан (US),
ЧЕН Ян (US)

(73) Патентообладатель(и):

ПФАЙЗЕР ПРОДАКТС ИНК. (US)

(54) ГЕН STREPTOMYCES AVERMITILIS И ЕГО ПРИМЕНЕНИЕ ДЛЯ ИЗМЕНЕНИЯ СООТНОШЕНИЯ АВЕРМЕКТИНОВ B2:B1

(57) Реферат:

Изобретение относится к области биотехнологии и может быть использовано при производстве антибиотиков авермектинов. Изобретение относится к полинуклеотиду, содержащему нуклеотидные последовательности, кодирующие продукт гена aveC, молекулы которого можно использовать для изменения соотношения количества авермектинов класса 2:1, продуцируемых в ферментационных культурах *S. avermitilis*. Нуклеотидная последовательность полинуклеотида по существу аналогична последовательности аллеля aveC *S. avermitilis*, последовательности плазмиды pSE186 (ATCC 209604), кодирующей продукт гена AveC *S. avermitilis*, нуклеотидной последовательности (НП) открытой рамки считывания (ORF) aveC, но при этом НП содержит мутации, кодирующие

комбинацию замен аминокислот, благодаря чему штамм *S. avermitilis* ATCC 53692, в клетках которого инактивирован аллель aveC дикого типа, способен продуцировать авермектины класса 2:1 в соотношении 0,35:1 или меньше (когда авермектины являются циклогексилом B2 и циклогексилом B1 соответственно). Изобретение относится также к векторам, клеткам-хозяевам и мутантным штаммам *S. avermitilis*, в которых ген aveC инактивирован или мутирован с возможностью изменения соотношения количества авермектинов класса 2:1. Изобретение касается способа получения мутированного штамма (комбинации замен аминокислот приводятся в формуле) и способа получения авермектинов класса 2:1 в уменьшенном соотношении, а также композиции, полученной указанным способом. Использование изобретения позволяет получить

ФИГ.1



FEDERAL SERVICE
FOR INTELLECTUAL PROPERTY,
PATENTS AND TRADEMARKS

(51) Int. Cl.

C12N 15/31 (2006.01)**C12N 1/21** (2006.01)**C12R 1/465** (2006.01)(12) **ABSTRACT OF INVENTION**(21), (22) Application: **2004124521/13, 31.01.2003**(24) Effective date for property rights: **31.01.2003**(30) Priority:
12.02.2002 (cl.1-17) US 60/356,222(43) Application published: **10.04.2005**(45) Date of publication: **10.02.2007 Bull. 4**(85) Commencement of national phase: **11.08.2004**(86) PCT application:
IB 03/00348 (31.01.2003)(87) PCT publication:
WO 03/068955 (21.08.2003)Mail address:
**129010, Moskva, ul. B.Spasskaja, 25, str.3,
OOO "Juridicheskaja firma Gorodisskij i
Partnery", pat.pov. E.E.Nazinoj, reg. № 517**

(72) Inventor(s):

**ShTUTT'sMAN-EhNGVALL' Kim Dzhonell (US),
GUSTAFSSON Klaehs Ehrik Daniehl' (US),
KREBBER Anke (US),
RAJLLARD Sun Aj (US),
MINShULL Dzhheremi Stiven (US),
KIM Seran (US),
ChEN Jan (US)**

(73) Proprietor(s):

PFAJZER PRODAKTS INK. (US)(54) **STREPTOMYCES AVERMITILIS GENE AND ITS USING FOR CHANGING RATIO OF AVERMECTINS B2:B1**

(57) Abstract:

FIELD: biotechnology, microbiology, antibiotics, genetic engineering, molecular biology.

SUBSTANCE: invention relates to a polynucleotide comprising nucleotide sequences encoding product of gene aveC molecules of that can be used for changing the ratio of amount of avermectins of class 2:1 produced in fermentation cultures of *S. avermitilis*. This nucleotide sequence is similar essentially with aveC allele sequence from *S. avermitilis*, plasmid pSE186 (ATCC 209604) sequence encoding product of gene aceC from *S. avermitilis*, nucleotide sequence of aveC open reading frame but this nucleotide sequence comprises mutations encoding combination of amino acids owing to the strain *S. avermitilis* ATCC 53692 in cells of them allele aveC of wild type is inactivated is able to produce avermectins of class 2:1 in the ratio 0.35:1 or less (when avermectins represent cyclohexyl B2

and cyclohexyl B1, respectively). Also, invention relates to vectors, host-cells and mutant strains of *S. avermitilis* wherein aveC gene is inactivated or mutated with the possibility for changing the ratio of amount of avermectins of class 2:1. Also, invention relates to a method for preparing the mutated strain (combination of amino acid changes are given in the invention claim) and a method for preparing avermectins of class 2:1 in the reduced state and to a composition prepared by a method given above. Using the proposed invention provides preparing the avermectins composition of class 2:1 with the reduced amount of avermectin B2 in the mixture. Invention can be used in producing avermectin antibiotics.

EFFECT: improved preparing method of avermectins.

17 cl, 21 dwg, 4 tbl, 8 ex

```

101 100
102 200
103 300
104 400
105 500
106 600
107 700
108 800
109 900
110 1000
111 1100
112 1200
1201 1229

```

Фиг.1

Описание

1. Область техники

Настоящее изобретение относится к композициям, содержащим авермектины, и способам эффективного получения авермектинов, таких как "дорамектин", которые находят широкое применение в ветеринарии. В частности, настоящее изобретение относится к молекулам полинуклеотидов, содержащим нуклеотидные последовательности, кодирующие продукт гена AveC, который можно использовать для модуляции отношения авермектинов класса 2:1, полученных ферментацией культур *Streptomyces avermitilis*. Настоящее изобретение далее относится к векторам, трансформированным клеткам-хозяевам и новым мутантным штаммам *S. avermitilis*, в которых ген aveC мутирован с возможностью модуляции соотношения продуцируемых авермектинов класса 2:1.

2. Предпосылки изобретения2.1. Авермектины

Виды из рода *Streptomyces* продуцируют целый ряд вторичных метаболитов, в том числе авермектины, которые образуют серию из восьми родственных шестнадцатичленных макроциклических лактонов, обладающих сильной антигельминтной и инсектицидной активностью. Восемь разных, но близко родственных соединений обозначены как A1a, A1b, A2a, A2b, B1a, B1b, B2a и B2b. Серия "а" указанных соединений включает природный авермектин, в котором заместитель в положении C25 является (S)-втор-бутилом, и серия "b" включает такие соединения, в которых заместитель в положении C25 является изопропилом. Символы "А" и "В" служат для обозначения авермектинов, в которых заместитель в положении C5 является соответственно метоксильной и гидроксильной группой. Цифрой "1" обозначены авермектины, у которых в положении C22,23 находится двойная связь, и цифрой "2" обозначены авермектины, содержащие атом водорода в положении C22 и гидроксильную группу в положении C23. Считается, что среди родственных авермектинов особенно сильной противопаразитарной и пестицидной активностью обладает авермектин типа В1, такой как дорамектин, который является наиболее привлекательным в коммерческом отношении.

Авермектины и способы их получения методом аэробной ферментации штаммов *S. avermitilis* описаны в патентах США №№ 4310519 и 4429042. Считается, что биосинтез природных авермектинов инициируется эндогенно CoA-аналогами сложного тиоэфира изомасляной кислоты и S-(+)-2-метилмасляной кислоты.

Улучшение штамма в результате неспецифического мутагенеза и использование экзогенно вводимых жирных кислот сделало возможным эффективное продуцирование аналогов авермектина. Мутанты *S. avermitilis*, в которых отсутствует 3-кетокислота-дегидрогеназа с разветвленной цепью (мутанты с отсутствием bkd), могут продуцировать авермектины только в процессе ферментации с введением жирных кислот. Скрининг и выделение мутантов, не обладающих активностью дегидрогеназы с разветвленной цепью (например, *S. avermitilis*, ATCC 53567), описаны в европейском патенте (EP) № 276103. Ферментация таких мутантов в присутствии экзогенно вводимых жирных кислот позволяет получить только четыре авермектина, соответствующих используемым жирным кислотам. Так, в результате ферментации *S. avermitilis* (ATCC 53567) с введением S-(+)-2-метилмасляной кислоты образуются природные авермектины A1a, A2a, B1a и B2a; в результате ферментации с введением изомасляной кислоты образуются природные авермектины A1b, A2b, B1b и B2b; и в результате ферментации с введением циклопентанкарбоновой кислоты образуются четыре новых циклопентилавермектина A1, A2, B1 и B2.

При введении других жирных кислот образуются новые авермектины. В результате скрининга более 800 предполагаемых предшественников было идентифицировано более 60 новых авермектинов. (См., например, Dutton et al., 1991, J. Antibiot. 44:357-365; and Banks et al., 1994, Roy. Soc. Chem. 147:16-26). Кроме того, мутанты *S. avermitilis*, не обладающие активностью 5-О-метилтрансферазы, продуцируют в основном только аналоги авермектинов В. Следовательно, мутанты *S. avermitilis*, у которых

отсутствует как 2-кетокислота-дегидрогеназа с разветвленной цепью, так и 5-О-метилтрансфераза, продуцируют только авермектины В, соответствующие жирной кислоте, используемой в процессе ферментации. Таким образом, при добавлении к таким двойным мутантам S-(+)-2-метилмасляной кислоты образуются только природные авермектины В1а и В2а, в то время как при добавлении изомасляной кислоты или циклопентанкарбоновой кислоты образуются соответственно природные авермектины В1b и В2b или новые циклопентилавермектины В1 и В2. Добавление к штамму с двумя мутациями циклогексанкарбоновой кислоты является предпочтительным способом получения коммерчески важного нового авермектина, такого как циклогексилавермектин В1 (дорамектин). Способы выделения и характеристики таких двойных мутантов, например S. avermitilis (ATCC 53692), описаны в европейском патенте № 276103.

2.2. Гены, участвующие в биосинтезе авермектина

Обнаружено, что во многих случаях гены, участвующие в продуцировании вторичных метаболитов, и гены, кодирующие определенный антибиотик, образуют в хромосоме совместные кластеры. Именно таким кластером является кластер генов поликетидсинтезы Streptomyces (PKS) (см. Hopwood and Sherman, 1990, Ann. Rev. Genet. 24:37-66). Таким образом, одним методом клонирования генов в процессе биосинтеза является выделение гена лекарственной устойчивости и исследование смежных областей хромосомы с целью обнаружения других генов, имеющих отношение к биосинтезу данного антибиотика. Другим методом клонирования генов, участвующих в биосинтезе важных метаболитов, является комплементация мутантов. Например, части библиотеки ДНК из организма, способного продуцировать определенный метаболит, вводят в мутант, не продуцирующий такой метаболит, и ведут поиск трансформантов, продуцирующих данный метаболит. Кроме того, для идентификации и клонирования генов в процессе биосинтеза используют гибридизацию библиотеки при помощи зондов, выделенных из других видов из рода Streptomyces.

Установлено, что гены, участвующие в биосинтезе авермектина (гены ave), подобно генам, необходимым для биосинтеза других вторичных метаболитов Streptomyces (например, PKS), образуют кластеры в хромосоме. Был успешно клонирован ряд генов ave с использованием векторов для комплементации мутантов S. avermitilis, блокируемых в процессе биосинтеза авермектина. Клонирование таких генов описано в патенте США № 5252474. Кроме того, Ikeda et al., 1995, J. Antibiot. 48: 532-534, описали локализацию области хромосомы, имеющей непосредственное отношение к дегидратации в положениях C22,23 (aveC) фрагмента BamHI длиной 4,82 т.п.о. S. avermitilis, а также к мутациям гена aveC, в результате чего образуется однокомпонентный продуцент В2а. Так как ивермектин, сильнодействующее антигельминтное соединение, можно получить химическим путем из авермектина В2а, то однокомпонентный продуцент авермектина В2а считается особенно пригодным для коммерческого получения ивермектина.

В патенте США № 6248579, выданном Stutzman-Engwall 19 июня 2001 г., описаны некоторые мутации гена aveC Streptomyces avermitilis, позволяющие уменьшить соотношение авермектинов циклогексил В2 : циклогексил В1 примерно до 0,75:1.

В заявке PCT WO 01/12821 компании Pfizer Products Inc., опубликованной 22 февраля 2001 г., описаны некоторые дополнительные мутации гена AveCa Streptomyces avermitilis, вызывающие дальнейшее уменьшение соотношения авермектинов циклогексил В2 : циклогексил В1 до 0,40:1.

Идентификация дополнительных мутаций или комбинаций мутаций в гене AveC, позволяющих значительно упростить продуцирование авермектина, таких как, например, мутации, уменьшающие соотношение авермектинов В2 : В1, должна облегчить получение и очистку коммерчески важных авермектинов.

3. Краткое изложение существа изобретения

Настоящее изобретение относится к молекуле полинуклеотида, содержащей нуклеотидную последовательность, которая по существу аналогична аллелю aveC Streptomyces avermitilis, последовательности плазмиды pSE186 (ATCC 209604),

кодирующей продукт гена AveC *S. avermitilis*, нуклеотидной последовательности открытой рамки считывания (ORF) aveC *S. avermitilis*, показанной на фигуре 1 (SEQ ID No.1), или их вырожденному варианту, но при этом имеет мутации, кодирующие комбинацию замен аминокислот в положении аминокислотных остатков, соответствующих положениям

- 5 аминокислот SEQ ID No.2, благодаря чему клетки штамма *S. avermitilis* ATCC 53692, в которых инактивирован аллель aveC дикого типа и которые экспрессируют молекулу полинуклеотида, содержащую мутированную нуклеотидную последовательность, способны продуцировать авермектины класса 2:1 с меньшим соотношением по сравнению с соотношением, продуцируемым клетками штамма *S. avermitilis* ATCC 53692,
- 10 экспрессирующими только аллель aveC дикого типа, причем, когда авермектины класса 2:1 являются авермектинами циклогексил B2:циклогексил B1, соотношение авермектинов класса 2:1 составляет 0,35:1 или меньше. В более предпочтительном варианте осуществления изобретения соотношение авермектинов циклогексил B2 : циклогексил B1 составляет примерно 0,30:1 или меньше. В еще более предпочтительном варианте
- 15 осуществления изобретения соотношение авермектинов циклогексил B2 : циклогексил B1 составляет примерно 0,25:1 или меньше. В наиболее предпочтительном варианте осуществления изобретения соотношение авермектинов циклогексил B2 : циклогексил B1 составляет примерно 0,20:1 или меньше.

- В конкретном варианте осуществления изобретения комбинация замен аминокислот
- 20 включает комбинацию, выбираемую из нижеследующего списка:

25

30

35

40

45

50

- (a) D48E, A61T, A89T, S138T, A139T, G179S, A198G, P289L;
 (b) G40S, D48E, L136P, G179S, E238D;
 (c) D48E, L136P, R163Q, G179S;
 5 (d) D48E, L136P, R163Q, G179S, E238D;
 (e) D48E, L136P, R163Q, G179S, A200G, E238D;
 (f) D48E, L136P, G179S, E238D;
 (g) D48E, A61T, L136P, G179S, E238D;
 10 (h) D48E, A61T, L136P, G179S;
 (i) D48E, A89T, S138T, A139T, G179S;
 (j) D48E, A61T, L136P, G179S, A198G, P202S, E238D, P289L;
 (k) D48E, A61T, L136P, S138T, A139F, G179S, E238D, P289L;
 15 (l) D48E, L136P, G179S, A198G, E238D, P289L;
 (m) D48E, A61T, S138T, A139F, G179S, A198G, P289L;
 (n) D48E, L84P, G111V, S138T, A139T, G179S, A198G, P289L;
 (o) Y28C, D48E, A61T, A89T, S138T, A139T, G179S, E238D;
 20 (p) D48E, A61T, A107T, S108G, L136P, G179S, S192A, E238D, P289L;
 (q) D48E, L136P, G179S, R250W;
 (r) D48E, A89T, S138T, A139T, R163Q, G179S;
 (s) D48E, L136P, G179S, A198G, P289L;
 25 (t) D48E, F78L, A89T, L136P, G179S;
 (u) D48E, A89T, S138T, A139T, G179S, E238D, F278L;
 (v) D48E, A89T, L136P, R163Q, G179S;
 (w) D48E, A61T, A89T, G111V, S138T, A139F, G179S, E238D, P289L;
 30 (x) D25G, D48E, A89T, L136P, S138T, A139T, V141A, I159T, R163Q, G179S;
 (y) D48E, A89T, S90G, L136P, R163Q, G179S, E238D;
 (z) D48E, A61T, A89T, G111V, S138T, A139T, G179S, E238D, P289L;
 (aa) D48E, A89T, S138T, A139T, G179S;
 35 (ab) D48E, L136P, R163Q, G179S, S231L;
 (ac) D48E, L136P, S138T, A139F, G179S, V196A, E238D;
 (ad) D48E, A61T, A89T, F99S, S138T, A139T, G179S, E238D;
 (ae) G35S, D48E, A89T, S138T, A139T, G179S, P289L;
 40 (af) D48E, A61T, A89T, S138T, A139T, G179S, V196A, E238D;

45

50

- (ag) D48E, A89T, G111V, S138T, A139T, G179S, A198G, E238D;
 (ah) S41G, D48E, A89T, L136P, G179S;
 (ai) D48E, A89T, L136P, R163Q, G179S, P252S;
 5 (aj) D48E, A89T, L136P, G179S, F234S;
 (ak) D48E, A89T, L136P, R163Q, G179S, E238D;
 (al) Q36R, D48E, A89T, L136P, G179S, E238D;
 (am) D48E, A89T, L136P, R163Q, G179S;
 10 (an) D48E, A89T, S138T, G179S;
 (ao) D48E, A89T, L136P, G179S, E238D;
 (ap) D48E, A89T, L136P, K154E, G179S, E238D;
 (aq) D48E, A89T, S138T, A139T, K154R, G179S, V196A, P289L;
 15 (ar) D48E, A89T, S138T, A139F, G179S, V196A, E238D;
 (as) D48E, A61T, A89T, L136P, G179S, V196A, A198G, P289L;
 (at) D48E, A61T, S138T, A139F, G179S, G196A, E238D, P289L;
 (au) D48E, A89T, L136P, G179S;
 20 (av) D48E, A89T, V120A, L136P, G179S;
 (aw) D48E, A61T, A89T, S138T, A139F, G179S, V196A, A198G, E238D;
 (ax) D48E, A61T, A89T, G111V, S138T, A139F, G179S, V196A, E238D;
 (ay) D48E, A61T, A89T, S138T, A139T, G179S, V196A, E238D, P289L;
 25 (az) D48E, A61T, A89T, L136P, S138T, A139F, G179S, A198G, E238D;
 (ba) D48E, A89T, S138T, A139F, G179S, A198G, V220A;
 (bb) D48E, A61T, A89T, S138T, A139T, G179S, V196A, E238D, R239H, P289L;
 (bc) D48E, A61T, A89T, L136P, G179S, P289L;
 30 (bd) D48E, A89T, S138T, A139T, G179S, V196A, E238D, P289L; и
 (be) D48E, A61T, A89T, S138T, A139F, G179S, V196A, E238D.

Настоящее изобретение далее относится к молекуле полинуклеотида, содержащей нуклеотидную последовательность, которая по существу аналогична аллелю *aveC* *Streptomyces avermitilis*, последовательности плазмиды pSE186 (ATCC 209604), кодирующей продукт гена *AveC S. avermitilis*, нуклеотидной последовательности открытой рамки считывания *aveC S. avermitilis*, показанной на фигуре 1 (SEQ ID No.1), или их вырожденному варианту, но при этом имеет мутации, кодирующие комбинацию замен аминокислот в положении аминокислотных остатков, соответствующих положениям аминокислот SEQ ID No.2, благодаря чему клетки штамма *S. avermitilis* ATCC 53692, в которых инактивирован аллель *aveC* дикого типа и которые экспрессируют молекулу полинуклеотида, содержащую мутированную нуклеотидную последовательность, способны продуцировать авермектины класса 2:1 с меньшим соотношением по сравнению с соотношением, продуцируемым клетками штамма *S. avermitilis* ATCC 53692, экспрессирующими только аллель *aveC* дикого типа, причем, когда авермектины класса 2:1 являются авермектинами циклогексил B2: циклогексил B1, соотношение авермектинов класса 2:1 уменьшается примерно до 0,40:1 или меньше, и комбинация замен аминокислот включает комбинацию, выбираемую из нижеследующей группы:

- (bf) D48E, S138T, A139T, G179S, E238D; и
 50 (bg) Y28C, Q38R, D48E, L136P, G179S, E238D.

Настоящее изобретение далее относится к рекомбинантному вектору, содержащему молекулу полинуклеотида по настоящему изобретению.

Настоящее изобретение далее относится к клетке-хозяину, содержащей молекулу

полинуклеотида или рекомбинантный вектор по настоящему изобретению. В предпочтительном варианте осуществления изобретения клетка-хозяин является клеткой *Streptomyces*. В более предпочтительном варианте осуществления изобретения клетка-хозяин является клеткой *Streptomyces avermitilis*.

5 Настоящее изобретение далее относится к способу получения нового штамма *Streptomyces avermitilis*, который включает (i) мутирование аллеля *aveC* в клетке штамма *S. avermitilis*, вызывающее комбинацию замен аминокислот в продукте гена *AveC*, или (ii) введение в клетку штамма *S. avermitilis* мутированного аллеля *aveC* или его вырожденного варианта, кодирующего продукт гена *AveC*, содержащий комбинацию замен

10 аминокислот, выбираемую из пунктов (a)-(be) приведенного выше списка.

Настоящее изобретение далее относится к способу получения нового штамма *Streptomyces avermitilis*, который включает (i) мутирование аллеля *aveC* в клетке штамма *S. avermitilis*, вызывающее комбинацию замен аминокислот в продукте гена *AveC*, или (ii) введение в клетку штамма *S. avermitilis* мутированного аллеля *aveC* или его

15 вырожденного варианта, кодирующего продукт гена *AveC*, включающий комбинацию замен аминокислот, благодаря чему клетки, содержащие мутированный аллель *aveC* или его вырожденный вариант, способны продуцировать авермектины циклогексил B2 : циклогексил B1 в соотношении 0,35:1 или меньше. В неограничивающем варианте осуществления изобретения мутированный аллель *aveC* или его вырожденный вариант

20 кодирует продукт гена *AveC*, содержащий комбинацию замен аминокислот, выбираемую из группы, включающей пункты (a)-(be) приведенного выше списка.

В предпочтительном варианте осуществления изобретения соотношение авермектинов циклогексил B2 : циклогексил B1 составляет примерно 0,30:1 или меньше. В неограничивающем варианте осуществления изобретения мутированный аллель *aveC* или

25 его вырожденный вариант кодирует продукт гена *AveC*, содержащий комбинацию замен аминокислот, выбираемую из группы, включающей пункты (f)-(be) приведенного выше списка.

В более предпочтительном варианте осуществления изобретения соотношение авермектинов циклогексил B2 : циклогексил B1 составляет примерно 0,25:1 или меньше. В

30 неограничивающем варианте осуществления изобретения мутированный аллель *aveC* или его вырожденный вариант кодирует продукт гена *AveC*, содержащий комбинацию замен аминокислот, выбираемую из группы, включающей пункты (w)-(be) приведенного выше списка.

В более предпочтительном варианте осуществления изобретения соотношение авермектинов циклогексил B2 : циклогексил B1 составляет примерно 0,20:1 или меньше. В

35 неограничивающем варианте осуществления изобретения мутированный аллель *aveC* или его вырожденный вариант кодирует продукт гена *AveC*, содержащий комбинацию замен аминокислот, выбираемую из группы, включающей пункты (ao)-(be) приведенного выше списка.

40 Настоящее изобретение далее относится к способу получения нового штамма *Streptomyces avermitilis*, который включает (i) мутирование аллеля *aveC* в клетке штамма *S. avermitilis*, вызывающее комбинацию замен аминокислот в продукте гена *AveC*, или (ii) введение в клетку штамма *S. avermitilis* мутированного аллеля *aveC* или его вырожденного варианта, кодирующего продукт гена *AveC*, содержащий комбинацию замен

45 аминокислот, выбираемую из группы, включающей пункты (bf) и (bg) приведенного выше списка. В предпочтительном варианте осуществления изобретения клетки *S. avermitilis*, содержащие такой мутированный аллель *aveC* или его вырожденный вариант, способны продуцировать авермектины циклогексил B2 : циклогексил B1 в соотношении около 0,40:1 или меньше.

50 Настоящее изобретение далее относится к клетке вида из рода *Streptomyces*, которая содержит мутированный аллель *aveC* *S. avermitilis* или его вырожденный вариант, кодирующий продукт гена *AveC*, содержащий комбинацию замен аминокислот, выбираемую из группы, включающей пункты (a)-(be) приведенного выше списка. В предпочтительном

варианте осуществления изобретения вид из рода *Streptomyces* является видом из рода *S. avermitilis*.

Настоящее изобретение далее относится к клетке *Streptomyces avermitilis*, способной продуцировать авермектины циклогексил В2: циклогексил В1 в соотношении 0,35:1 или меньше. В неограничивающем варианте осуществления изобретения указанная клетка содержит мутированный аллель *aveC* или его вырожденный вариант, кодирующий продукт гена *AveC*, содержащий комбинацию замен аминокислот, выбираемую из группы, включающей пункты (a)-(be) приведенного выше списка.

В предпочтительном варианте осуществления изобретения соотношение авермектинов циклогексил В2:циклогексил В1 составляет примерно 0,30:1 или меньше. В неограничивающем варианте осуществления изобретения указанные клетки содержат мутированный аллель *aveC* или его вырожденный вариант, кодирующий продукт гена *AveC*, содержащий комбинацию замен аминокислот, выбираемую из группы, включающей пункты (f)-(be) приведенного выше списка.

В более предпочтительном варианте осуществления изобретения соотношение авермектинов циклогексил В2 : циклогексил В1 составляет примерно 0,25:1 или меньше. В неограничивающем варианте осуществления изобретения указанные клетки содержат мутированный аллель *aveC* или его вырожденный вариант, кодирующий продукт гена *AveC*, содержащий комбинацию замен аминокислот, выбираемую из группы, включающей пункты (w)-(be) приведенного выше списка.

В более предпочтительном варианте осуществления изобретения соотношение авермектинов циклогексил В2:циклогексил В1 составляет примерно 0,20:1 или меньше. В неограничивающем варианте осуществления изобретения указанные клетки содержат мутированный аллель *aveC* или его вырожденный вариант, кодирующий продукт гена *AveC*, содержащий комбинацию замен аминокислот, выбираемую из группы, включающей пункты (ao)-(be) приведенного выше списка.

Настоящее изобретение далее относится к клетке вида из рода *Streptomyces*, которая содержит мутированный аллель *aveC* *S. avermitilis* или его вырожденный вариант, кодирующий продукт гена *AveC*, содержащий комбинацию замен аминокислот, выбираемую из группы, включающей пункты (bf) и (bg) приведенного выше списка. В предпочтительном варианте осуществления изобретения вид из рода *Streptomyces* является видом из рода *S. avermitilis*. В более предпочтительном варианте осуществления изобретения указанная клетка является клеткой *S. avermitilis*, способной продуцировать авермектины циклогексил В2 : циклогексил В1 в соотношении около 0,40:1 или меньше.

Настоящее изобретение далее относится к способу получения авермектинов, который включает культивирование штамма клеток *Streptomyces avermitilis* по настоящему изобретению в культуральной среде в условиях, стимулирующих или индуцирующих продуцирование авермектинов, и выделение указанных авермектинов из культуры.

Настоящее изобретение далее относится к композиции авермектинов циклогексил В2 : циклогексил В1, продуцируемой клетками *Streptomyces avermitilis* в культуральной среде, используемой для культивирования клеток, в которой соотношение авермектинов циклогексил В2 : циклогексил В1 составляет 0,35:1 или меньше, предпочтительно около 0,30:1 или меньше, более предпочтительно около 0,25:1 или меньше и наиболее предпочтительно около 0,20:1 или меньше. В конкретном варианте осуществления изобретения композицию авермектинов циклогексил В2 : циклогексил В1 продуцируют клетки штамма *S. avermitilis*, экспрессирующие мутированный аллель *aveC* или его вырожденный вариант, кодирующий генный продукт, благодаря чему уменьшается соотношение авермектинов циклогексил В2 : циклогексил В1 класса 2:1, продуцированных указанными клетками, по сравнению с клетками такого же штамма *S. avermitilis*, которые экспрессируют только аллель *aveC* дикого типа и не экспрессируют мутированный аллель *aveC*.

В предпочтительном варианте осуществления изобретения, в котором указанная композиция включает авермектины циклогексил В2 : циклогексил В1 в соотношении 0,35:1

или меньше, данную композицию продуцируют клетки, содержащие мутированный аллель *aveC* или его вырожденный вариант, кодирующий продукт гена *AveC*, содержащий комбинацию замен аминокислот, выбираемую из группы, включающей пункты (a)-(be) приведенного выше списка.

5 В более предпочтительном варианте осуществления изобретения, в котором указанная композиция включает авермектины циклогексил B2 : циклогексил B1 в соотношении около 0,30:1 или меньше, данную композицию продуцируют клетки, содержащие мутированный аллель *aveC* или его вырожденный вариант, кодирующий продукт гена *AveC*, содержащий комбинацию замен аминокислот, выбираемую из группы, включающей пункты (f) и (be) приведенного выше списка.

10 В более предпочтительном варианте осуществления изобретения, в котором указанная композиция включает авермектины циклогексил B2 : циклогексил B1 в соотношении около 0,25:1 или меньше, данную композицию продуцируют клетки, содержащие мутированный аллель *aveC* или его вырожденный вариант, кодирующий продукт гена *AveC*, содержащий комбинацию замен аминокислот, выбираемую из группы, включающей пункты (w)-(be) приведенного выше списка.

15 В более предпочтительном варианте осуществления изобретения, в котором указанная композиция включает авермектины циклогексил B2 : циклогексил B1 в соотношении около 0,20:1 или меньше, данную композицию продуцируют клетки, содержащие мутированный аллель *aveC* или его вырожденный вариант, кодирующий продукт гена *AveC*, содержащий комбинацию замен аминокислот, выбираемую из группы, включающей пункты (ao)-(be) приведенного выше списка.

20 Настоящее изобретение далее относится к композиции авермектинов циклогексил B2 : циклогексил B1, продуцированной клетками *Streptomyces avermitilis* в культуральной среде, используемой для культивирования указанных клеток, в которой соотношение авермектинов циклогексил B2 : циклогексил B1 составляет примерно 0,40:1 или меньше, а также клетками, содержащими мутированный аллель *aveC* или его вырожденный вариант, кодирующий продукт гена *AveC*, содержащий комбинацию замен аминокислот, выбираемую из группы, включающей пункты (bf) и (bg) приведенного выше списка.

30 4. Краткое описание чертежей

Фигура 1. Последовательность ДНК (SEQ ID No.1), содержащая открытую рамку считывания *aveC* *S. avermitilis* и выделенную аминокислотную последовательность (SEQ ID No.2).

35 Фигура 2. Плазмидный вектор pSE186 (ATCC 209604), содержащий полную открытую рамку считывания гена *aveC* *S. avermitilis*.

Фигура 3. Вектор замещения гена pSE180 (ATCC 209605), содержащий ген *ermE* *Sacc. erythraea*, встроенный в открытую рамку считывания *aveC* *S. avermitilis*.

40 Фигура 4. Рестрикционная карта *Bam*HI кластера генов поликетидсинтазы авермектина в *S. avermitilis* с пятью идентифицированными перекрывающимися космидными клонами (то есть pSE65, pSE66, pSE67, pSE68, pSE69). Указана также взаимосвязь между pSE118 и pSE119.

45 Фигура 5. Анализ методом ВЭЖХ продуктов ферментации, продуцированных штаммами *S. avermitilis*. Количественное определение пиков выполнено путем сравнения со стандартными количествами циклогексилавермектина B1. Время удерживания циклогексилавермектина B2 равно 7,4-7,7 мин; время удерживания циклогексилавермектина B1 равно 11,9-12,3 мин. Фиг. 5A. Штамм SE180-11 *S. avermitilis* с открытой рамкой считывания инактивированного аллеля *aveC*. Фиг. 5B. Штамм SE180-11 *S. avermitilis*, трансформированный плазмидой pSE186 (ATCC 209604). Фиг. 5C. Штамм SE180-11 *S. avermitilis*, трансформированный плазмидой pSE187. Фиг. 5D. Штамм SE180-11 *S. avermitilis*, трансформированный плазмидой pSE188.

50 Фигура 6A-M. Компилированный список комбинаций замен аминокислот, кодированных мутациями в аллеле *aveC*, определенный во втором цикле "перестановки генов", и их влияние на соотношение продуцируемых авермектинов циклогексил B2 : циклогексил B1.

Для каждой плазмиды в верхней блоке колонки, озаглавленной "Мутации", указаны замены аминокислот и в нижнем блоке перечислены замены нуклеотидных оснований, приводящие к замене указанных аминокислот. Замены нуклеотидных оснований, указанные в скобках, являются молчащими заменами, то есть они не вызывают изменений аминокислотной

5 последовательности.

5. Подробное описание изобретения

Настоящее изобретение относится к идентификации и исследованию молекул полинуклеотидов, содержащих нуклеотидные последовательности, кодирующие продукт гена AveC, продуцированного *Streptomyces avermitilis*, к созданию новых штаммов *S. avermitilis*, которые можно использовать для скрининга мутированных продуктов гена AveC с целью определения их влияния на продуцирование авермектина, и к открытию того, что некоторые мутированные продукты гена AveC могут уменьшать соотношение авермектинов B2:B1, продуцированных *S. avermitilis*. В качестве примера в нижеследующих разделах данного изобретения описана молекула полинуклеотида, содержащая нуклеотидную последовательность, которая аналогична последовательности плазмиды pSE186 (ATCC 209604), кодирующей продукт гена AveC *S. avermitilis*, или нуклеотидной последовательности открытой рамки считывания, показанной на фигуре 1 (SEQ ID No.1), и молекулы полинуклеотидов, содержащие мутированные нуклеотидные последовательности и их вырожденные варианты. Однако принципы, изложенные в настоящем изобретении, в равной степени применимы к другим молекулам полинуклеотидов, включающим наряду с прочими гомологичные гены *aveC*, продуцируемые другими видами из рода *Streptomyces*, например, *S. hygroscopicus* и *D. griseochromogenes*.

5.1. Молекулы полинуклеотидов, кодирующие продукт гена AveC *S. avermitilis*

Настоящее изобретение относится к выделенной молекуле полинуклеотида, содержащей полную открытую рамку считывания *aveC S. avermitilis* или ее значительную часть, причем в указанной молекуле полинуклеотида отсутствует следующая полная открытая рамка считывания, расположенная внизу от открытой рамки считывания *aveC in situ* в хромосоме *S. avermitilis*.

Выделенная молекула полинуклеотида по настоящему изобретению предпочтительно содержит нуклеотидную последовательность, которая аналогична последовательности плазмиды pSE186 (ATCC 209604), кодирующей продукт гена AveC *S. avermitilis*, нуклеотидной последовательности открытой рамки считывания, показанной на фигуре 1 (SEQ ID No.1), или ее значительной части. В используемом здесь значении термин "значительная часть" выделенной молекулы полинуклеотида, содержащей нуклеотидную последовательность, кодирующую продукт гена AveC *S. avermitilis*, означает выделенную молекулу полинуклеотида, которая содержит по крайней мере около 70% последовательности полной открытой рамки считывания *aveC*, показанной на фигуре 1 (SEQ ID No.1), и кодирует функционально эквивалентный продукт гена AveC. Таким образом, "функционально эквивалентный" продукт гена AveC определяется как генный продукт, который при экспрессии в штамме *S. avermitilis* ATCC 53692, в котором инактивирован нативный аллель *aveC*, вызывает продуцирование авермектинов по существу в таком же соотношении и количестве, что и при продуцировании штаммом *S. avermitilis* ATCC 53692, экспрессирующим только функциональный аллель *aveC* дикого типа, который является нативным для штамма *S. avermitilis* ATCC 53692.

Помимо нуклеотидной последовательности открытой рамки считывания *aveC* выделенная молекула полинуклеотида по настоящему изобретению может далее содержать нуклеотидные последовательности, которые фланкируют ген *aveC in situ* в *S. avermitilis*, в частности последовательности, фланкирующие нуклеотидные последовательности, показанные на фигуре 1 (SEQ ID No.1).

Настоящее изобретение далее относится к выделенной молекуле полинуклеотида, содержащей нуклеотидную последовательность SEQ ID No.1 или ее вырожденный вариант на основе известной вырожденности генетического кода.

В используемом здесь значении термины "молекула полинуклеотида", "полинуклеотидная последовательность", "кодирующая последовательность", "открытая рамка считывания" и "ORF" означают молекулы ДНК и РНК, которые могут быть одноцепочечными или двухцепочечными и могут быть транскрибированы и транслированы (ДНК) или транслированы (РНК) в продукт гена AveC или полипептид, гомологичный продукту гена AveC, в соответствующей экспрессирующей системе клетки-хозяина под контролем соответствующих регуляторных элементов. Кодированная последовательность может включать, не ограничиваясь ими, прокариотические последовательности, последовательности кДНК, последовательности геномной ДНК и последовательности химически синтезированных ДНК и РНК.

Нуклеотидная последовательность, показанная на фигуре 1 (SEQ ID No.1), содержит четыре разных кодона GTG в положениях пар оснований 42, 174, 177 и 180. Как ранее было описано в патенте США № 6248579, несколько делеций в 5'-концевой области открытой рамки считывания aveC (фигура 1; SEQ ID No.1) были созданы для определения того, какие из указанных кодонов могут функционировать в открытой рамке считывания aveC в качестве сайтов инициации экспрессии белка. Делеция первого сайта GTG в положении пары оснований 42 не устраняла активность гена AveC. Дополнительная делеция всех кодонов GTG в положениях пар оснований 174, 177 и 180 подавляла активность гена AveC, что указывало на необходимость данной области для экспрессии белка. Таким образом, в объем настоящего изобретения входят открытые рамки считывания aveC переменной длины.

Настоящее изобретение далее относится к молекуле полинуклеотида, содержащей нуклеотидную последовательность, гомологичную последовательности плазмиды pSE186 (ATCC 209604), кодирующей продукт гена AveC *S. avermitilis*, или нуклеотидной последовательности открытой рамки считывания aveC, показанной на фигуре 1 (SEQ ID No.1), или ее значительной части. Термин "гомологичный" применительно к молекуле полинуклеотида, которая гомологична последовательности, кодирующей продукт гена AveC *S. avermitilis*, означает молекулу полинуклеотида, содержащую нуклеотидную последовательность, которая (а) кодирует такой же продукт гена AveC, что и последовательность плазмиды pSE186 (ATCC 209604), кодирующая продукт гена AveC *S. avermitilis*, или кодирует такой же продукт гена AveC, что и нуклеотидная последовательность открытой рамки считывания aveC, показанная на фигуре 1 (SEQ ID No.1), но включает одну или несколько молчащих замен в нуклеотидной последовательности в соответствии с вырожденностью генетического кода (то есть вырожденный вариант); или (b) гибридизирует с комплементом молекулы полинуклеотида, содержащей нуклеотидную последовательность, которая кодирует аминокислотную последовательность, кодируемую последовательностью плазмиды pSE186 (ATCC 209604), кодирующей продукт гена AveC, и кодирует аминокислотную последовательность, показанную на фигуре 1 (SEQ ID No.2), в умеренно строгих условиях, то есть при осуществлении гибридизации с фильтрсвязанной ДНК в 0,5 M NaHPO₄, 7% додецилсульфата натрия (SDS), 1 mM EDTA при 65°C и выполнении промывки в 0,2×SSC/0,1% SDS при 42°C (см. Ausubel et al. (eds.), 1989, Current Protocols in Molecular Biology, Vol. I, Green Publishing Associates, Inc., and John Wiley & Sons, Inc., New York, at p. 2.10.3), и кодирует вышеуказанный функционально эквивалентный продукт гена AveC. В предпочтительном варианте осуществления изобретения гомологичная молекула полинуклеотида гибридизирует с комплементом нуклеотидной последовательности плазмиды pSE186 (ATCC 209604), кодирующей продукт гена AveC, или с комплементом нуклеотидной последовательности открытой рамки считывания aveC, показанной на фигуре 1 (SEQ ID No.1), или ее значительной части в очень строгих условиях, то есть при осуществлении гибридизации с фильтрсвязанной ДНК в 0,5 M NaHPO₄, 7% SDS, 1 mM EDTA при 65°C и выполнении промывки в 0,1×SSC/0,1% SDS при 68°C (Ausubel et al., 1989, см. выше), и кодирует вышеуказанный функционально эквивалентный продукт гена AveC.

Активность продукта гена AveC и его потенциальных функциональных эквивалентов можно определить при помощи анализа методом ВЭЖХ продуктов ферментации, как это описано в нижеследующих примерах. Молекулы полинуклеотидов, содержащие

5 продукта гена AveC *S. avermitilis*, могут включать естественные гены AveC, присутствующие в других штаммах *S. avermitilis*, гомологичные гены AveC, присутствующие в других видах из рода *Streptomyces*, и мутированные аллели aveC, которые являются естественными или созданными методами рекомбинантных ДНК.

Настоящее изобретение далее относится к молекуле полинуклеотида, содержащей
10 нуклеотидную последовательность, которая кодирует полипептид, имеющий аминокислотную последовательность, гомологичную аминокислотной последовательности, кодированной последовательностью плазмиды pSE186 (ATCC 209604), кодирующей продукт гена AveC, или аминокислотной последовательности, показанной на фигуре 1 (SEQ ID No.2), или ее значительной части. В используемом здесь значении термин
15 "значительная часть" аминокислотной последовательности, показанной на фигуре 1 (SEQ ID No.2), означает полипептид, содержащий по крайней мере около 70% аминокислотной последовательности, показанной на фигуре 1 (SEQ ID No.2), и представляющий собой вышеуказанный функционально эквивалентный продукт гена AveC.

В используемом здесь значении применительно к аминокислотным

20 последовательностям, гомологичным аминокислотной последовательности продукта гена AveC, продуцированного штаммом *S. avermitilis*, термин "гомологичный" относится к полипептиду, который имеет аминокислотную последовательность, показанную на фигуре 1 (SEQ ID No.2), в которой один или несколько аминокислотных остатков консервативно заменены другим аминокислотным остатком, при этом указанная аминокислотная
25 последовательность по крайней мере примерно на 70%, более предпочтительно по крайней мере примерно на 80% и наиболее предпочтительно по крайней мере примерно на 90% идентична полипептиду, кодированному последовательностью плазмиды pSE186 (ATCC 209604), кодирующей продукт гена AveC, или аминокислотной последовательности, показанной на фигуре 1 (SEQ ID No.2), при определении с помощью стандартного
30 алгоритма идентичности аминокислотных последовательностей, такого как алгоритм BLASTP (GENBANK, NCBI), и, кроме того, такая консервативная замена позволяет получить вышеуказанный функционально эквивалентный генный продукт. Консервативные замены аминокислот хорошо известны в данной области. Правила выполнения таких замен описаны наряду с другими научными работами в публикации Dayhof, M.D., 1978, Nat.
35 Biomed. Res. Found., Washington, D.C., Vol. 5, Sup. 3. В частности, консервативные замены аминокислот представляют собой такие замены, которые обычно происходят в семействе аминокислот, родственных в отношении кислотности или полярности.

Генетически кодированные аминокислоты обычно делят на четыре группы: (1) кислые = аспартат, глутамат; (2) основные = лизин, аргинин, гистидин; (3) неполярные = аланин,
40 валин, лейцин, изолейцин, пролин, фенилаланин, метионин, триптофан; и (4) незаряженные полярные = глицин, аспарагин, глутамин, цистеин, серин, треонин, тирозин. Фенилаланин, триптофан и тирозин классифицированы также как ароматические аминокислоты. Одна или несколько замен в любой из указанных групп, например замена лейцина изолейцином или валином, аспартата глутаматом, треонина серином или любого
45 другого аминокислотного остатка структурно родственным аминокислотным остатком, например аминокислотным остатком с одинаковой кислотностью или полярностью либо сходной комбинацией свойств, обычно оказывает незначительное воздействие на функцию полипептида.

Методы получения и обработки молекул полинуклеотидов по данному изобретению
50 известны в данной области и могут быть выполнены методами рекомбинантных ДНК, описанными, например, в публикациях Maniatis, et al., 1989, Molecular Cloning, A Laboratory Manual. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY; Ausubel, et al., 1989, Current Protocols In Molecular Biology, Greene Publishing Associates &

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, которые включены в данное

5 описание изобретения в качестве ссылки. Клоны полинуклеотидов, кодирующие продукты гена AveC или продукты гомологичного гена AveC, можно идентифицировать любыми методами, известными в данной области, которые включают, не ограничиваясь ими, методы, рассмотренные в нижеследующем разделе 7. Библиотеки геномных ДНК можно исследовать с целью обнаружения последовательностей, кодирующих aveC и гомолог
10 aveC, при помощи методов, описанных в публикации Benton and Davis, 1977, Science 196: 180 для скрининга библиотек бактериофагов, и в публикации Grunstein and Hogness, 1975, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 72:3961-3965 для скрининга плазмидных библиотек. Молекулы полинуклеотидов, содержащие нуклеотидные последовательности, которые, как известно, включают открытую рамку считывания aveC, имеющуюся, например, в плазмиде
15 pSE186 (ATCC 209604) или в плазмиде pSE119 (описанные в нижеследующем разделе 7), можно использовать в качестве зондов в указанных экспериментах по скринингу. Альтернативно, можно синтезировать олигонуклеотидные зонды, которые соответствуют нуклеотидным последовательностям, выделенным из неполных или полных аминокислотных последовательностей очищенного продукта гомологичного гена AveC.

20 5.2. Рекомбинантные системы

5.2.1. Клонирование и экспрессирующие векторы

Настоящее изобретение далее относится к рекомбинантным клонирующим векторам и экспрессирующим векторам, предназначенным для клонирования или экспрессии молекул полинуклеотидов по настоящему изобретению, которые включают, например, открытую
25 рамку считывания aveC *S. avermitilis* или открытые рамки считывания любых гомологов aveC. В соответствии с неограничивающим вариантом осуществления настоящее изобретение относится к плазмиде pSE186 (ATCC 209604), которая содержит полную открытую рамку считывания гена aveC *S. avermitilis*.

Все нижеследующее описание открытой рамки считывания aveC из *S. avermitilis*,
30 молекулы полинуклеотида, содержащей открытую рамку считывания aveC из *S. avermitilis* или ее часть, или продукта гена AveC *S. avermitilis* относится также к мутированным аллелям aveC, рассматриваемым ниже, за исключением четко оговоренных случаев или случаев, следующих из контекста.

Для конкретного использования в штамме *Streptomyces* создан целый ряд разных
35 векторов, включающих фаг, мультикопийные плазмиды, малокопийные плазмиды и шаттл-векторы *E. coli* *Streptomyces*, и любые из указанных векторов могут быть использованы при осуществлении настоящего изобретения. Кроме того, в штамме *Streptomyces* был клонирован ряд генов лекарственной устойчивости, и некоторые из указанных генов были встроены в векторы в качестве селективируемых маркеров. Примеры существующих
40 векторов, пригодных для использования в штамме *Streptomyces*, приведены в публикации Hutchinson, 1980, Applied Biochem. Biotech. 16:169-190.

Рекомбинантные векторы по настоящему изобретению, в частности экспрессирующие векторы, предпочтительно сконструированы так, чтобы кодирующая последовательность молекулы полинуклеотида по данному изобретению была функционально связана с одним
45 или несколькими регуляторными элементами, необходимыми для транскрипции и трансляции кодирующей последовательности для продуцирования полипептида. В используемом здесь значении термин "регуляторный элемент" означает, не ограничиваясь ими, нуклеотидные последовательности, кодирующие индуцируемые и неиндуцируемые промоторы, энхансеры, операторы и другие элементы, которые, как известно в данной
50 области, служат для инициации и/или регулирования экспрессии кодирующих полинуклеотид последовательностей. Кроме того, в используемом здесь значении кодирующая последовательность "функционально связана" с одним или несколькими регуляторными элементами, которые эффективно регулируют и делают возможной

транскрипцию кодирующей последовательности или трансляцию ее мРНК либо обеспечивают выполнение обеих функций.

Типичные плазмидные векторы, которые могут содержать молекулу полинуклеотида по настоящему изобретению, включают наряду с прочими pCR-Blunt, pCR2.1 (Invitrogen),
 5 pGEM3Zf (Promega) и шаттл-вектор pWHM3 (Vara et al., 1989, J. Bact. 171:5872-5881).

В данной области хорошо известны методы создания рекомбинантных векторов, содержащих определенные кодирующие последовательности, функционально связанные с соответствующими регуляторными элементами, и такие методы могут быть использованы при осуществлении настоящего изобретения. Указанные методы включают методы
 10 рекомбинантных ДНК *in vitro*, методы синтеза и методы генетической рекомбинации *in vivo*. См., например, методы, описанные в публикациях Maniatis et al., 1989, приведена выше; Ausubel et al., 1989, приведена выше; Sambrook et al., 1989, приведена выше; Innis et al., 1995, приведена выше, и Erlich, 1992, приведена выше.

Регуляторные элементы указанных векторов могут характеризоваться разной силой и
 15 специфичностью. В зависимости от применяемой системы хозяин/вектор можно использовать любые элементы, пригодные для транскрипции и трансляции.

Неограничивающие примеры областей регуляции транскрипции или промоторов для бактерий включают промотор β -gal, промотор T7, промотор TAC, верхний и
 20 нижний γ -промоторы, промоторы *trp* и *lac*, слитые промоторы *trp-lac* и специально для *Streptomyces* промоторы *ermE*, *melC*, *tipA* и т.д. В соответствии с конкретным вариантом осуществления изобретения может быть создан экспрессирующий вектор, содержащий открытую рамку считывания *aveC* или мутированную открытую рамку считывания, клонированную рядом с сильным структурным промотором, таким как промотор *ermE*,
 25 выделенный из *Saccharopolyspora erythraea*. Как описано в патенте США № 6248579, вектор, содержащий промотор *ermE*, был введен в штамм *S. avermitilis*, и результаты последующего анализа продуктов ферментации методом ВЭЖХ свидетельствовали об увеличении титра продуцированных авермектинов по сравнению с количеством, продуцированным тем же штаммом, экспрессирующим только аллель *aveC* дикого типа.

Векторы экспрессии слитого белка можно использовать для экспрессии слитого белка
 30 продукта гена *AveC*. Очищенный слитый белок можно использовать для получения антисыворотки против продукта гена *AveC*, исследования биохимических свойств продукта гена *AveC*, создания слитых белков *AveC*, обладающих разной биохимической активностью, или облегчения идентификации или очистки экспрессированного продукта гена *AveC*.
 35 Возможные векторы экспрессии слитого белка включают, не ограничиваясь ими, векторы, содержащие последовательности, кодирующие продукты слияния β -галактозидазы и *trpE*, продукты слияния мальтозы со связывающим белком, продукты слияния глутатиона с S-трансферазой и продукты слияния полигистидинов (несущие области). В альтернативном варианте осуществления изобретения продукт гена *AveC* или его часть могут быть слиты с продуктом гомологичного гена *AveC* или его частью, выделенными из другого вида из рода
 40 или штамма *Streptomyces*, такого как, например, *S. hygrosopicus* или *S. griseochromogenes*. Такие гибридные векторы могут быть введены в клетки *S. avermitilis* и испытаны для определения их воздействия, например, на соотношение продуцированных авермектинов класса 2:1.

Слитые белки *AveC* могут содержать область, пригодную для очистки. Например,
 45 продукты слияния *AveC*, мальтозы и связывающего белка могут быть очищены при помощи амилозной смолы; белки, полученные в результате слияния *AveC*, глутатиона и S-трансферазы, могут быть очищены при помощи глутатион-агарозных шариков, и продукты слияния *AveC* и полигистидина могут быть очищены при помощи смолы, содержащей двухвалентный никель. Альтернативно для очистки слитого белка при помощи аффинной
 50 хроматографии можно использовать антитела против белка-носителя или пептида. Например, нуклеотидная последовательность, кодирующая эпитоп-мишень моноклонального антитела, может быть функционально связана в экспрессирующем векторе с регуляторными элементами и расположена с возможностью слияния

экспрессированного эпитопа с полипептидом гена AveC. Например, нуклеотидная последовательность, кодирующая меченый эпитоп FLAG™ (International Biotechnologies Inc.), являющийся гидрофильным маркерным пептидом, может быть встроена стандартными методами в экспрессирующий вектор на участке, соответствующем, например, карбоксильному концу полипептида гена AveC. Экспрессированный продукт слияния полипептида AveC и эпитопа FLAG™ затем может быть обнаружен и подвергнут аффинной очистке с использованием коммерчески производимых антител против FLAG™.

Экспрессирующий вектор, кодирующий слитый белок AveC, может также содержать полилинкерные последовательности, кодирующие сайты расщепления специфической протеазой, благодаря чему экспрессированный полипептид AveC может быть выделен из несущей области или продукта слияния в результате обработки специфической протеазой. Например, вектор слитого белка может содержать последовательности ДНК, кодирующие сайты расщепления тромбином или Ха-фактором.

При помощи известных методов в экспрессирующий вектор может быть встроена сигнальная последовательность, расположенная в рамке считывания вверх от открытой рамки считывания aveC, которая направляет миграцию и секрецию экспрессированного генного продукта. Неограничивающие примеры сигнальных последовательностей включают последовательности, выделенные из α -фактора, иммуноглобулинов, белков наружных оболочек, пенициллиназы и рецепторов Т-клеток.

Для облегчения выбора клеток-хозяев, трансформированных или трансфецированных клонирующими или экспрессирующими векторами по настоящему изобретению, указанный вектор может далее содержать кодирующую последовательность для продукта гена-репортера или другого селектируемого маркера. Такая кодирующая последовательность предпочтительно функционально связана с вышеописанными последовательностями, кодирующими регуляторные элементы. Гены-репортеры, пригодные для использования в данном изобретении, хорошо известны в данной области и включают гены-репортеры, кодирующие зеленый флуоресцирующий белок, люциферазу, хуIE и тирозиназу. Нуклеотидные последовательности, кодирующие селектируемые маркеры, хорошо известны в данной области и включают последовательности, которые кодируют генные продукты, сообщающие устойчивость к антибиотикам или антиметаболитам, или удовлетворяют требованию ауксотрофности. Примеры таких последовательностей включают последовательности, кодирующие устойчивость к эритромицину, тиострептон или канамицину наряду с прочими антибиотиками.

5.2.2. Трансформация клеток-хозяев

Настоящее изобретение далее относится к трансформированным клеткам-хозяевам, содержащим молекулу полинуклеотида или рекомбинантный вектор по данному изобретению, и выделенным из них новым штаммам или линиям клеток. Клетки-хозяева, пригодные для осуществления данного изобретения, предпочтительно являются клетками *Streptomyces*, хотя можно также использовать другие прокариотические или эукариотические клетки. Такие трансформированные клетки-хозяева обычно включают, не ограничиваясь ими, микроорганизмы, такие как бактерии, трансформированные рекомбинантными векторами ДНК бактериофага, плазмидной ДНК или космидной ДНК, или дрожжи, трансформированные рекомбинантными векторами наряду с прочими векторами.

Молекулы полинуклеотидов по настоящему изобретению предназначены для функционирования в клетках *Streptomyces*, но могут быть также введены в другие бактериальные или эукариотические клетки, например, с целью клонирования или экспрессии. Обычно используют штамм *E. coli*, такой как, например, штамм DH5 α , который можно получить из Американской коллекции типовых культур (ATCC), Роквилль, шт. Мэриленд, США (№ доступа 31343) и коммерческих источников (Stratagene). Предпочтительные эукариотические клетки-хозяева включают дрожжевые клетки, хотя можно также эффективно использовать клетки млекопитающих или насекомых.

Рекомбинантный экспрессирующий вектор по данному изобретению предпочтительно

вводят, например, путем трансформации или трансфекции в одну или несколько клеток-хозяев по существу гомогенной культуры клеток. Экспрессирующий вектор обычно вводят в клетки-хозяева известными методами, такими как, например, трансформация протопластов, осаждение фосфатом кальция, обработка хлоридом кальция,

5 микроинъекция, электропорация, трансфекция при контактировании с рекомбинированным вирусом, трансфекция, опосредуемая липосомами, трансфекция DEAE-декстраном, трансдукция, конъюгирование или бомбардировка микрочастицами. Трансформанты можно выбрать стандартными методами, например, выбирая клетки, экспрессирующие вышеописанный селектируемый маркер, такой как устойчивость к антибиотикам, связанный с рекомбинантным вектором.

10 После введения экспрессирующего вектора в клетку-хозяина интеграцию и сохранение последовательности, кодирующей aveC, в хромосоме клетки-хозяина или эписоме можно проверить стандартными методами, например при помощи анализа гибридизации методом саузерн-блоттинга, анализа рестрикционного фермента, анализа PCR, включая PCR с использованием обратной транскриптазы (rt-PCR) или иммунологического анализа, 15 предназначенного для обнаружения предполагаемого генного продукта. Клетки-хозяева, содержащие и/или экспрессирующие последовательность, кодирующую рекомбинантный aveC, можно идентифицировать любым по крайней мере из четырех общих методов, хорошо известных в данной области, которые включают: (i) гибридизацию ДНК-ДНК, ДНК-РНК или РНК-антисмысловая РНК; (ii) обнаружение наличия функций гена-"маркера"; (iii) 20 оценку уровня транскрипции путем измерения экспрессии aveC-специфических транскриптов мРНК в клетке-хозяине; и (iv) обнаружение присутствия зрелого полипептида, определяемого, например, при помощи иммуноанализа или по наличию биологической активности AveC (например, продуцирование в клетках-хозяевах S. 25 avermitilis авермектинов, являющихся показателем активности AveC, в соответствующих соотношениях и количествах).

5.2.3. Экспрессия и исследование продукта рекомбинантного гена AveC

После того как последовательность, кодирующая нативный или мутированный aveC, устойчиво введена в соответствующую клетку-хозяина, трансформированную клетку-хозяина 30 размножают клонированием и образовавшиеся клетки выращивают в условиях, обеспечивающих максимальное продуцирование продукта нативного или мутированного гена AveC. Такие условия обычно включают выращивание клеток до высокой плотности. Если экспрессирующий вектор содержит индуцируемый промотор, создают условия, необходимые для индукции экспрессии, которые включают, например, изменение 35 температуры, удаление питательных веществ, добавление приемлемых индукторов (например, аналогов углеводов, таких как изопропил- β -D-тиогалактопиранозид (IPTG)), накопление избытка побочных продуктов обмена вещества и тому подобные.

Если продукт экспрессированного гена AveC остается внутри клеток-хозяев, клетки собирают и лизируют, продукт выделяют и очищают от лизата в условиях экстракции, 40 известных в данной области, которые позволяют свести до минимума разрушение белка, например, при 4°C или в присутствии ингибиторов протеазы либо при создании обоих условиях. Если продукт экспрессированного гена AveC секретируется из клеток-хозяев, можно просто собрать истощенную питательную среду и выделить из нее продукт.

Продукт экспрессированного гена AveC можно выделить или очистить от клеточных 45 лизатов или культуральной среды при помощи стандартных методов, которые включают, не ограничиваясь ими, любую комбинацию нижеследующих методов: осаждение сульфатом аммония, вытеснительное фракционирование, ионообменную хроматографию, ВЭЖХ, центрифугирование в градиенте плотности и аффинную хроматографию. Если продукт экспрессированного гена AveC обладает биологической активностью, более высокую 50 степень чистоты препарата можно контролировать на каждой стадии очистки при помощи соответствующего анализа. Независимо от того, обладает продукт экспрессированного гена AveC биологической активностью или нет, его можно обнаружить на основании величины выхода, способности взаимодействовать с антителом, специфическим для AveC,

или наличия метки слияния. В используемом здесь значении продукт гена AveC считается "по существу очищенным", если данный продукт составляет примерно более 20 мас.% от содержания белка в конкретном препарате. Кроме того, в используемом здесь значении продукт гена AveC считается "выделенным", если данный продукт составляет по крайней мере около 80 мас.% от содержания белка в конкретном препарате.

Таким образом, настоящее изобретение относится к выделенному или по существу очищенному продукту рекомбинантно экспрессированного гена AveC *S. avermitilis*, содержащему аминокислотную последовательность, кодируемую последовательностью плазмиды pSE186 (ATCC 209604), кодирующей продукт гена AveC, или аминокислотную последовательность, показанную на фигуре 1 (SEQ ID No.2), или ее значительную часть, а также их мутированные и вырожденные варианты.

Настоящее изобретение далее относится к способу получения продукта гена AveC, который включает культивирование клетки-хозяина, трансформированной рекомбинантным экспрессирующим вектором, содержащим молекулу полинуклеотида, имеющую нуклеотидную последовательность, кодирующую продукт гена AveC, причем молекула полинуклеотида функционально связана с одним или несколькими регуляторными элементами, контролирующими экспрессию молекулы полинуклеотида в клетке-хозяине в условиях, необходимых для продуцирования продукта рекомбинантного гена AveC, и выделение продукта гена AveC из культуры клеток.

Продукт рекомбинантно экспрессированного гена AveC *S. avermitilis* пригоден для разных целей, включая скрининг соединений, изменяющих функцию продукта гена AveC и модулирующих таким образом биосинтез авермектина, и получение антител против продукта гена AveC.

После получения продукта гена AveC достаточной чистоты его можно исследовать стандартными методами, включающими SDS-PAGE, вытеснительную хроматографию, анализ аминокислотной последовательности, анализ биологической активностью при продуцировании соответствующих продуктов в процессе биосинтеза авермектина и т.д. Например, аминокислотную последовательность продукта гена AveC можно определить стандартными методами секвенирования пептида. Продукт гена AveC можно далее исследовать при помощи анализа гидрофильности (см., например, Hopp and Woods, 1981, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 78:3824) или аналогичных программных алгоритмов для идентификации гидрофобных и гидрофильных областей в продукте гена AveC. Можно выполнить структурный анализ для идентификации областей продукта гена AveC, которые предполагают наличие специфических вторичных структур. Биофизические методы, такие как рентгеновская кристаллография (Engstrom, 1974, Biochem. Exp. Biol. 11:7-13), компьютерное моделирование (Fletterick and Zoller (eds.), 1986, in: Current Communications in Molecular Biology. Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY) и ядерный магнитный резонанс (ЯМР), можно использовать для картирования и исследования сайтов взаимодействия между продуктом гена AveC и его субстратом. Информацию, полученную в результате выполнения вышеуказанных исследований, можно использовать для выбора новых сайтов для мутации в открытой рамке считывания aveC, получения новых штаммов *S. avermitilis*, обладающих более привлекательными характеристиками продуцирования авермектина.

5.3. Создание и использование мутантов AveC

Главным объектом настоящего изобретения является идентификация новых мутаций в аллеле aveC *S. avermitilis*, которые вызывают изменение и наиболее предпочтительно уменьшение соотношения авермектинов B2:B1. Таким образом, настоящее изобретение относится к молекулам полинуклеотидов, пригодным для получения новых штаммов клеток *S. avermitilis*, которые характеризуются поддающимся обнаружению изменением продуцирования авермектина по сравнению с клетками такого же штамма, экспрессирующими только аллель aveC дикого типа. В предпочтительном варианте осуществления изобретения такие молекулы полинуклеотидов пригодны для получения новых штаммов клеток *S. avermitilis*, которые продуцируют авермектины класса 2:1 в

меньшем соотношении по сравнению с клетками такого же штамма, экспрессирующими только аллель *aveC* дикого типа. Клетки таких штаммов могут также содержать дополнительные мутации, способствующие продуцированию большего количества avermектинов по сравнению с клетками такого же штамма, экспрессирующими только аллель *aveC* дикого типа.

Мутации аллеля *aveC* или кодирующей последовательности включают любые мутации, которые вызывают замену, делецию и/или добавление одной или нескольких аминокислот в продукт гена *AveC* или укорачивание продукта гена *AveC*, либо любые комбинации указанных мутаций, а также мутации, позволяющие достичь требуемого результата.

Предполагается, что такие последовательности мутированного аллеля *aveC* включают любые вырожденные варианты. Например, настоящее изобретение относится к молекуле полинуклеотида, содержащей нуклеотидную последовательность аллеля *aveC* или ее вырожденный вариант, последовательность плазмиды pSE186 (ATCC 209604), кодирующую продукт гена *AveC*, или ее вырожденный вариант или нуклеотидную последовательность открытой рамки считывания *aveC* *S. avermitilis*, показанную на фигуре 1 (SEQ ID No.1), или ее вырожденный вариант, которая далее включает мутации, кодирующие комбинацию замен аминокислот в выбранных положениях структуры продукта гена *AveC*. В неограничивающем варианте осуществления изобретения такие замены происходят в положении одной или нескольких аминокислот продукта гена *AveC*, соответствующих положениям аминокислот 25, 28, 35, 36, 38, 40, 41, 48, 55, 61, 78, 84, 89, 90, 99, 107, 108, 111, 120, 123, 136, 138, 139, 141, 154, 159, 163, 179, 192, 196, 198, 200, 202, 220, 228, 229, 230, 231, 234, 238, 239, 250, 252, 266, 275, 278, 289 или 298 SEQ ID No.2. Предпочтительные комбинации положений аминокислот, в которых происходит замена, включают один или несколько аминокислотных остатков D48, A61, A89, L136, S138, A139, R163, G179, V196, A198, E238 и P289. Особенно предпочтительные комбинации замен аминокислот включают замены в положениях D48 и G179, более конкретно D48E и G179S. Конкретные примеры комбинаций замен аминокислот, вызывающих уменьшение соотношения averмектинов циклогексил B2 : циклогексил B1, показаны на фигуре 6A-J.

Таким образом, настоящее изобретение относится к молекуле полинуклеотида, содержащей нуклеотидную последовательность, которая по существу аналогична аллелю *aveC* *Streptomyces avermitilis*, последовательности плазмиды pSE186 (ATCC 209604), кодирующей продукт гена *AveC* *S. avermitilis*, нуклеотидной последовательности открытой рамки считывания *aveC* *S. avermitilis*, показанной на фигуре 1 (SEQ ID No.1), или их вырожденному варианту, но при этом имеет мутации, кодирующие комбинацию замен аминокислот в положениях аминокислотных остатков, соответствующих положениям аминокислот SEQ ID No.2, благодаря чему клетки штамма *S. avermitilis* ATCC 53692, в которых инактивирован аллель *aveC* дикого типа и которые экспрессируют молекулу полинуклеотида, содержащую мутированную нуклеотидную последовательность, способны продуцировать averмектины класса 2:1 в меньшем соотношении по сравнению с соотношением, продуцируемым клетками штамма *S. avermitilis* ATCC 53692, экспрессирующими только аллель *aveC* дикого типа, причем когда averмектины класса 2:1 являются averмектинами циклогексил B2 : циклогексил B1, соотношение averмектинов класса 2:1 составляет 0,35:1 или меньше. В более предпочтительном варианте осуществления изобретения соотношение averмектинов циклогексил B2 : циклогексил B1 составляет примерно 0,30:1 или меньше. В еще более предпочтительном варианте осуществления изобретения соотношение averмектинов циклогексил B2 : циклогексил B1 составляет примерно 0,25:1 или меньше. В наиболее предпочтительном варианте осуществления изобретения соотношение averмектинов циклогексил B2 : циклогексил B1 составляет примерно 0,20:1 или меньше.

В конкретном варианте осуществления изобретения комбинация замен аминокислот включает комбинацию группы (a): D48E, A61T, A89T, S138T, A139T, G179S, A198G, P289L. Неограничивающим примером плазмиды, кодирующей указанные замены аминокислот,

В другом конкретном варианте осуществления изобретения комбинация замен аминокислот включает комбинацию группы (o): Y28C, D48E, A61T, A89T, A138T, A139T, G179S, E238D. Неограничивающим примером плазмиды, кодирующей указанные замены аминокислот, является плазида pSE535.

5 В другом конкретном варианте осуществления изобретения комбинация замен аминокислот включает комбинацию группы (p): D48E, A61T, A107T, S108G, L136P, G179S, S192A, E238D, P289L. Неограничивающим примером плазмиды, кодирующей указанные замены аминокислот, является плазида pSE542.

10 В другом конкретном варианте осуществления изобретения комбинация замен аминокислот включает комбинацию группы (q): D48E, L136P, G179S, R250W. Неограничивающим примером плазмиды, кодирующей указанные замены аминокислот, является плазида pSE545.

15 В другом конкретном варианте осуществления изобретения комбинация замен аминокислот включает комбинацию группы (r): D48E, A89T, S138T, A139T, R163Q, G179S. Неограничивающим примером плазмиды, кодирующей указанные замены аминокислот, является плазида pSE548.

20 В другом конкретном варианте осуществления изобретения комбинация замен аминокислот включает комбинацию группы (s): D48E, L136P, G179S, A198G, P289L. Неограничивающим примером плазмиды, кодирующей указанные замены аминокислот, является плазида pSE552.

В другом конкретном варианте осуществления изобретения комбинация замен аминокислот включает комбинацию группы (t): D48E, F78L, A89T, L136P, G179S. Неограничивающим примером плазмиды, кодирующей указанные замены аминокислот, является плазида pSE557.

25 В другом конкретном варианте осуществления изобретения комбинация замен аминокислот включает комбинацию группы (u): D48E, A89T, S138T, A139T, G179S, E238D, F278L. Неограничивающими примерами плазмид, кодирующих указанные замены аминокислот, являются плазмиды pSE564 и pSE565.

30 В другом конкретном варианте осуществления изобретения комбинация замен аминокислот включает комбинацию группы (v): D48E, A89T, L136P, R163Q, G179S. Неограничивающим примером плазмиды, кодирующей указанные замены аминокислот, является плазида pSE568.

35 В другом конкретном варианте осуществления изобретения комбинация замен аминокислот включает комбинацию группы (w): D48E, A61T, A89T, G111V, S138T, A139F, G179S, E238D, P289L. Неограничивающим примером плазмиды, кодирующей указанные замены аминокислот, является плазида pSE543.

40 В другом конкретном варианте осуществления изобретения комбинация замен аминокислот включает комбинацию группы (x): D25G, D48E, A89T, L136P, S138T, A139T, V141A, I159T, R163Q, G179S. Неограничивающим примером плазмиды, кодирующей указанные замены аминокислот, является плазида pSE504.

В другом конкретном варианте осуществления изобретения комбинация замен аминокислот включает комбинацию группы (y): D48E, A89T, S90G, L136P, R163Q, G179S, E238D. Неограничивающим примером плазмиды, кодирующей указанные замены аминокислот, является плазида pSE508.

45 В другом конкретном варианте осуществления изобретения комбинация замен аминокислот включает комбинацию группы (z): D48E, A61T, A89T, G111V, S138T, A139T, G179S, E238D, P289L. Неограничивающим примером плазмиды, кодирующей указанные замены аминокислот, является плазида pSE511.

50 В другом конкретном варианте осуществления изобретения комбинация замен аминокислот включает комбинацию группы (aa): D48E, A89T, S138T, A139T, G179S. Неограничивающим примером плазмиды, кодирующей указанные замены аминокислот, является плазида pSE520.

В другом конкретном варианте осуществления изобретения комбинация замен

аминокислот включает комбинацию группы (ab): D48E, L136P, R163Q, G179S, S231L.

Неограничивающим примером плазмиды, кодирующей указанные замены аминокислот, является плазида pSE523.

В другом конкретном варианте осуществления изобретения комбинация замен

5 аминокислот включает комбинацию группы (ас): D48E, L136P, S138T, A139F, G179S, V196A, E238D. Неограничивающим примером плазмиды, кодирующей указанные замены аминокислот, является плазмида pSE527.

В другом конкретном варианте осуществления изобретения комбинация замен

аминокислот включает комбинацию группы (ad): D48E, A61T, A89T, F99S, S138T, A139T,
10 G179S, E238D. Неограничивающим примером плазмиды, кодирующей указанные замены
аминокислот, является плаزمида pSE539.

В другом конкретном варианте осуществления изобретения комбинация замен

аминокислот включает комбинацию группы (ae): G35S, D48E, A89T, S138T, A139T, G179S, P289L. Неограничивающим примером плазмиды, кодирующей указанные замены

15 аминокислот, является плазмиды рSE540.

В другом конкретном варианте осуществления изобретения комбинация замен

аминокислот включает комбинацию группы (af): D48E, A61T, A89T, S138T, A139T, G179S, V196A, E238D. Неограничивающим примером плазмиды, кодирующей указанные замены аминокислот, является плазмида pSE547.

20 В другом конкретном варианте осуществления изобретения комбинация замен

аминокислот включает комбинацию группы (ag): D48E, A89T, G111V, S138T, A139T, G179S, A198G, E238D. Неограничивающим примером плазмиды, кодирующей указанные замены аминокислот, является плазмида pSE550.

В другом конкретном варианте осуществления изобретения комбинация замен

25 аминокислот включает комбинацию группы (ah): S41G, D48E, A89T, L136P, G179S. Неограничивающим примером плазмиды, кодирующей указанные замены аминокислот, является плазмида pSE558.

В другом конкретном варианте осуществления изобретения комбинация замен

аминокислот включает комбинацию группы (ai): D48E, A89T, L136P, R163Q, G179S, P252S.

30 Неограничивающим примером плазмиды, кодирующей указанные замены аминокислот, является плазмида pSE563.

В другом конкретном варианте осуществления изобретения комбинация замен

аминокислот включает комбинацию группы (aj): D48E, A89T, L136P, G179S, F234S.

Неограничивающим примером плазмиды, кодирующей указанные замены аминокислот,

35 является плазмида pSE566.

В другом конкретном варианте осуществления изобретения комбинация замен

аминокислот включает комбинацию группы (ак): D48E, A89T, L136P, R163Q, G179S, E238D.

Неограничивающими примерами плазмид, кодирующих указанные замены аминокислот, являются плазмиды pSE573 и pSE578.

40 В другом конкретном варианте осуществления изобретения комбинация замен

аминокислот включает комбинацию группы (al): Q36R, D48E, A89T, L136P, G179S, E238D.

Неограничивающим примером плазмиды, кодирующей указанные замены аминокислот, является плазмида pSE574.

В другом конкретном варианте осуществления изобретения комбинация замен

45 аминокислот включает комбинацию группы (am): D48E, A89T, L136P, R163Q, G179S.

Неограничивающими примерами плазмид, кодирующих указанные замены аминокислот, являются плазмиды pSE575 и pSE576.

В другом конкретном варианте осуществления изобретения комбинация замен

аминокислот включает комбинацию группы (an): D48E, A89T, S138T, G179S.

50 Неограничивающим примером плазмиды, кодирующей указанные замены аминокислот, является плазида pSE577.

В другом конкретном варианте осуществления изобретения комбинация замен

аминокислот включает комбинацию группы (ao): D48E, A89T, L136P, G179S, E238D.

Неограничивающими примерами плазмид, кодирующих указанные замены аминокислот, являются плазмиды pSE502 и pSE524.

В другом конкретном варианте осуществления изобретения комбинация замен аминокислот включает комбинацию группы (ap): D48E, A89T, L136P, K154E, G179S, E238D.

5 Неограничивающим примером плазмиды, кодирующей указанные замены аминокислот, является плазида pSE503.

В другом конкретном варианте осуществления изобретения комбинация замен аминокислот включает комбинацию группы (aq): D48E, A89T, S138T, A139T, K154R, G179S, V196A, P289L. Неограничивающим примером плазмиды, кодирующей указанные замены

10 аминокислот, является плазида pSE505.

В другом конкретном варианте осуществления изобретения комбинация замен аминокислот включает комбинацию группы (ar): D48E, A89T, S138T, A139F, G179S, V196A, E238D. Неограничивающим примером плазмиды, кодирующей указанные замены аминокислот, является плазида pSE506.

15 В другом конкретном варианте осуществления изобретения комбинация замен аминокислот включает комбинацию группы (as): D48E, A61T, A89T, L136P, G179S, V196A, A198G, P289L. Неограничивающим примером плазмиды, кодирующей указанные замены аминокислот, является плазида pSE507.

В другом конкретном варианте осуществления изобретения комбинация замен аминокислот включает комбинацию группы (at): D48E, A61T, S138T, A139F, G179S, G196A, E238D, P289L. Неограничивающим примером плазмиды, кодирующей указанные замены

аминокислот, является плазида pSE509.

В другом конкретном варианте осуществления изобретения комбинация замен аминокислот включает комбинацию группы (au): D48E, A89T, L136P, G179S.

25 Неограничивающими примерами плазмид, кодирующих указанные замены аминокислот, являются плазмиды pSE514 и pSE525.

В другом конкретном варианте осуществления изобретения комбинация замен аминокислот включает комбинацию группы (av): D48E, A89T, V120A, L136P, G179S.

Неограничивающим примером плазмиды, кодирующей указанные замены аминокислот, является плазида pSE515.

В другом конкретном варианте осуществления изобретения комбинация замен аминокислот включает комбинацию группы (aw): D48E, A61T, A89T, S138T, A139F, G179S, V196A, A198G, E238D. Неограничивающим примером плазмиды, кодирующей указанные замены аминокислот, является плазида pSE517.

35 В другом конкретном варианте осуществления изобретения комбинация замен аминокислот включает комбинацию группы (ax): D48E, A61T, A89T, G111V, S138T, A139F, G179S, V196A, E238D. Неограничивающим примером плазмиды, кодирующей указанные замены аминокислот, является плазида pSE518.

В другом конкретном варианте осуществления изобретения комбинация замен аминокислот включает комбинацию группы (ay): D48E, A61T, A89T, S138T, A139T, G179S, V196A, E238D, P289L. Неограничивающими примерами плазмид, кодирующих указанные замены аминокислот, являются плазмиды pSE529 и pSE554.

В другом конкретном варианте осуществления изобретения комбинация замен аминокислот включает комбинацию группы (az): D48E, A61T, A89T, L136P, S138T, A139F, G179S, A198G, E238D. Неограничивающим примером плазмиды, кодирующей указанные замены аминокислот, является плазида pSE532.

В другом конкретном варианте осуществления изобретения комбинация замен аминокислот включает комбинацию группы (ba): D48E, A89T, S138T, A139F, G179S, A198G, V220A. Неограничивающим примером плазмиды, кодирующей указанные замены

50 аминокислот, является плазида pSE536.

В другом конкретном варианте осуществления изобретения комбинация замен аминокислот включает комбинацию группы (bb): D48E, A61T, A89T, S138T, A139T, G179S, V196A, E238D, R239H, P289L. Неограничивающим примером плазмиды, кодирующей

указанные замены аминокислот, является плаزمида pSE537.

В другом конкретном варианте осуществления изобретения комбинация замен аминокислот включает комбинацию группы (bc): D48E, A61T, A89T, L136P, G179S, P289L. Неограничивающим примером плазмиды, кодирующей указанные замены аминокислот, является плазмида pSE541.

В другом конкретном варианте осуществления изобретения комбинация замен аминокислот включает комбинацию группы (bd): D48E, A89T, S138T, A139T, G179S, V196A, E238D, P289L. Неограничивающими примерами плазмид, кодирующих указанные замены аминокислот, являются плазмиды pSE549 и pSE553.

В другом конкретном варианте осуществления изобретения комбинация замен аминокислот включает комбинацию группы (be): D48E, A61T, A89T, S138T, A139F, G179S, V196A, E238D. Неограничивающим примером плазмиды, кодирующей указанные замены аминокислот, является плазмида pSE551.

Настоящее изобретение далее относится к молекуле полинуклеотида, содержащей нуклеотидную последовательность, которая по существу аналогична аллелю *aveC* *Streptomyces avermitilis*, последовательности плазмиды pSE186 (ATCC 209604), кодирующей продукт гена *AveC* *S. avermitilis*, нуклеотидной последовательности открытой рамки считывания *aveC* *S. avermitilis*, показанной на фигуре 1 (SEQ ID No.1), или их вырожденному варианту, но при этом имеет мутации, кодирующие комбинацию замен аминокислот в положении аминокислотных остатков, соответствующих положениям аминокислот SEQ ID No.2, благодаря чему клетки штамма *S. avermitilis* ATCC 53692, в которых инактивирован аллель *aveC* дикого типа и которые экспрессируют молекулу полинуклеотида, содержащую мутированную нуклеотидную последовательность, способны продуцировать авермектины класса 2:1 с меньшим соотношением по сравнению с соотношением, продуцируемым клетками штамма *S. avermitilis* ATCC 53692, экспрессирующими только аллель *aveC* дикого типа, причем когда авермектины класса 2:1 являются авермектинами циклогексил B2 : циклогексил B1, соотношение авермектинов класса 2:1 уменьшается примерно до 0,40:1 или меньше, и комбинация замен аминокислот включает комбинацию, выбираемую из нижеследующей группы:

(bf) D48E, S138T, A139T, G179S, E238D; и

(bg) Y28C, Q38R, D48E, L136P, G179S, E238D.

Неограничивающими примерами плазмиды, кодирующей замены аминокислот группы (bf), являются pSE556 и pSE569. Неограничивающим примером плазмиды, кодирующей замены аминокислот группы (bg), является pSE561.

В соответствии с настоящим изобретением любые вышеуказанные замены аминокислот могут быть выполнены в результате любой модификации нуклеотидной последовательности аллеля *aveC* или ее вырожденного варианта, которая вызывает такие замены. Например, большинство вышеописанных замен аминокислот можно произвести, заменяя последовательность нативного кодона или ее вырожденный вариант любым альтернативным кодоном, кодирующим такую же замену аминокислот. Все возможные последовательности, которые могут кодировать вышеуказанные замены аминокислот, должны быть очевидны специалисту в данной области на основании данного описания изобретения и известной вырожденности генетического кода. В неограничивающем варианте осуществления изобретения любая вышеуказанная комбинация замен аминокислот включает немолчащие замены нуклеотидов, показанные на фигуре 6.

В используемом здесь значении фраза "комбинация замен аминокислот включает комбинацию группы..." и подобные фразы означают, что замены аминокислот в продукте гена *AveC* по настоящему изобретению включают по крайней мере специально указанные замены и могут включать другие замены, делеции, добавления аминокислот или их комбинации, благодаря чему экспрессия продукта гена *AveC* в клетке *S. avermitilis* характеризуется требуемым уменьшением соотношения авермектинов B2:B1.

Мутации в аллеле *aveC* или его вырожденном варианте могут быть выполнены целым рядом известных методов, таких как PCR с возможностью ошибок или кластерный

мутагенез. В частности, олигонуклеотид-направленный мутагенез можно использовать для целевого изменения последовательности аллеля *aveC* или открытой рамки считывания, например, для введения одного или нескольких сайтов рестрикции или терминирующего кодона в специфические области аллеля *aveC* или открытой рамки считывания. Методы, аналогичные описанным в патентах США №№ 5605793, 5830721 и 5837458, которые включают неспецифическую фрагментацию, повторные циклы мутагенеза и перестановку нуклеотидов, можно также использовать для создания крупных библиотек полинуклеотидов, содержащих нуклеотидные последовательности, кодирующие мутации *aveC*.

Могут быть выполнены направленные мутации, особенно в тех случаях, когда они позволяют изменить один или несколько консервативных аминокислотных остатков в продукте гена *AveC*. Например, сравнение выделенной аминокислотной последовательности продукта гена *AveC S. avermitilis* (SEQ ID No.2) с продуктами гомологичного гена *AveC*, продуцированными *S. griseochromogenes* (SEQ ID No.5) и *S. hygroscopicus* (SEQ ID No.4), описанными в патенте США № 6248579, позволяет выявить сайты наиболее консервативных аминокислотных остатков в двух видах. Направленный мутагенез, вызывающий замену одного или нескольких указанных консервативных аминокислотных остатков, может быть весьма эффективным для получения новых мутантных штаммов, продуцирующих авермектин с требуемыми изменениями.

Кроме того, хорошие результаты могут быть получены при выполнении неспецифического мутагенеза в клетках *S. avermitilis* под воздействием ультрафиолетового или рентгеновского излучения либо химических мутагенов, таких как N-метил-N'-нитрозогуанидин, этилметансульфонат, азотистая кислота или горчичный газ. См., например, приведенную выше публикацию Ausubel, 1989, для ознакомления с методами мутагенеза.

Полученные мутированные молекулы полинуклеотидов исследуют для определения их способности модулировать биосинтез авермектинов в *S. avermitilis*. В предпочтительном варианте осуществления изобретения молекулу полинуклеотида, содержащую мутированную нуклеотидную последовательность, испытывают методом комплементации штамма *S. avermitilis*, в котором был инактивирован ген *aveC*, с целью создания отрицательного фона для *aveC* (*aveC'*). При осуществлении способа, не ограничивающего объем изобретения, мутированную молекулу полинуклеотида сплайсируют с получением экспрессирующей плазмиды, функционально связанной с одним или несколькими регуляторными элементами, которая также предпочтительно содержит один или несколько генов лекарственной устойчивости, позволяющих выбрать трансформированные клетки. Указанный вектор затем вводят в клетки-хозяева с *aveC'* при помощи известных методов, после чего трансформированные клетки отбирают и культивируют в соответствующих ферментационных средах в условиях, стимулирующих или индуцирующих продуцирование авермектина, например, в результате введения в среду соответствующих иницирующих субъединиц и культивирования в условиях, оптимальными для продуцирования авермектина. Продукты ферментации анализируют ВЭЖХ для определения способности мутированной молекулы полинуклеотида дополнять клетку-хозяина. Несколько плазмидных векторов, несущих мутированные молекулы полинуклеотидов, способные уменьшать соотношение авермектинов B2:B1, в том числе pSE188, pSE199, pSE231, pSE239 и pSE290-pSE297, рассмотрены в нижеследующем разделе 8.3. Другие примеры таких плазмидных векторов приведены на фигуре 6.

Любые вышеуказанные способы по настоящему изобретению можно осуществлять, используя ферментационные культуральные среды, предпочтительно содержащие циклогексанкарбоновую кислоту, хотя можно также использовать другие приемлемые предшественники жирных кислот, в частности, предшественники жирных кислот, приведенные в таблице 1, или метилтиомолочную кислоту.

После идентификации мутированной молекулы полинуклеотида, модулирующей продуцирование авермектина в требуемом направлении, можно определить расположение

мутации в нуклеотидной последовательности. Например, молекулу полинуклеотида, содержащую нуклеотидную последовательность, кодирующую продукт мутированного гена AveC, можно выделить методом PCR или произвести анализ последовательности ДНК известными методами. Сравнивая последовательность ДНК мутированного аллеля aveC с

последовательностью аллеля aveC дикого типа, можно определить мутации, ответственные за изменение продуцирования авермектина. Например, у продуктов гена AveC *S. avermitilis*, содержащих одинарные замены аминокислот в положении любых остатков 55 (S55F), 138 (S138T), 139 (A139T) или 230 (G230D) или двойные замены в положениях 138 (S138T) и 139 (A139T или A139F), произошло изменение функции продукта гена AveC, в результате чего изменилось соотношение авермектинов класса 2:1 (см. нижеследующий раздел 8); указанные положения аминокислот соответствуют показанным на фигуре 1 (SEQ ID No.2). Кроме того, было установлено, что семь нижеследующих комбинаций мутаций эффективно уменьшают соотношение авермектинов класса 2:1: (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. В объем настоящего изобретения входят пятьдесят девять (59) дополнительных комбинаций мутаций, которые, как установлено, уменьшают соотношение авермектинов циклогексил B2 : циклогексил B1; указанные мутации показаны на фигуре 6 и приведены в прилагаемой формуле изобретения.

Используемые в данном описании изобретения вышеуказанные обозначения, такие как A139T, содержат однобуквенное название аминокислотного остатка, которым в данном примере является аланин (A), в указанном положении, которым в данном примере является положение 139 (см. SEQ ID No.2) полипептида, с последующим указанием аминокислотного остатка, заменяющего исходный аминокислотный остаток, которым в данном примере является треонин (T).

Когда аминокислотный остаток, кодированный аллелем aveC в хромосоме *S. avermitilis*, векторе или выделенной молекуле полинуклеотида по настоящему изобретению, "соответствует" определенному аминокислотному остатку SEQ ID No.2 или когда замена аминокислоты происходит в определенном положении, "соответствующем" положению конкретного аминокислотного остатка SEQ ID No.2, предполагается, что такой аминокислотный остаток находится в таком же относительном положении в продукте гена AveC, которое специалист в данной области может легко определить, обратившись к аминокислотной последовательности, обозначенной в данном описании изобретения как SEQ ID No.2.

Когда конкретные мутации в аллеле aveC, кодирующем определенные мутации, представляют собой замены оснований в положениях конкретных нуклеотидов в аллеле aveC, "соответствующих" положениям определенных нуклеотидов, показанным в SEQ ID No.1, или когда положение нуклеотида в аллеле aveC "соответствует" положению определенного нуклеотида в SEQ ID No.1, предполагается, что указанный нуклеотид находится в таком же относительном положении в нуклеотидной последовательности aveC или ее вырожденном варианте, которое специалист в данной области может легко определить, обратившись к нуклеотидной последовательности, обозначенной в данном описании изобретения как SEQ ID No.1.

В определении соотношений авермектинов циклогексил B2 : циклогексил B1 термин "примерно" определяет данное числовое значение с возможным отклонением плюс или минус 10% от указанного значения.

Молекула полинуклеотида по настоящему изобретению может быть определена термином "выделенная", который означает, что данная молекула (i) очищена в такой степени, что она по существу не загрязнена другими молекулами полинуклеотидов, содержащими другие нуклеотидные последовательности, (ii) находится в окружении, в котором она не встречается в естественных условиях, например, когда аллель aveC, выделенный из *S. avermitilis*, или его мутированный вариант присутствует в клетке, не являющейся клеткой *S. avermitilis*, или (iii) имеет форму, не присущую ей в

естественных условиях, например, представляет собой более короткий фрагмент ДНК, такой как рестрикционный фрагмент, выделенный из бактериальной хромосомы и содержащий в основном *aveC*-кодирующую область или ее мутированный вариант с какими-либо связанными регуляторными последовательностями или без них; встроена в гетерологичный фрагмент ДНК, такой как хромосома бактериальной клетки (не являющейся

5 клеткой *S. avermitilis*), или в ДНК вектора, такого как плазмида или фаг, или встроена в хромосому *S. avermitilis* в локусе, не являющемся локусом нативного аллеля *aveC*.

Настоящее изобретение далее относится к рекомбинантному вектору, содержащему молекулу полинуклеотида по настоящему изобретению. Такой рекомбинантный вектор можно использовать для направленной доставки любых молекул полинуклеотидов, содержащих мутированные нуклеотидные последовательности по настоящему изобретению, к сайту аллеля *aveC* хромосомы *S. avermitilis* для вставки в открытую рамку считывания *aveC* или замены указанной рамки считывания или ее части, например, путем гомологичной рекомбинации. Однако молекула полинуклеотида, содержащая мутированную нуклеотидную последовательность по настоящему изобретению, может также модулировать биосинтез авермектина при введении в хромосому *S. avermitilis* на сайте, не относящемся к аллелю *aveC*, или при нахождении в эписоме клеток *S. avermitilis*. Таким образом, настоящее изобретение далее относится к векторам, содержащим молекулу полинуклеотида, имеющую мутированную нуклеотидную последовательность по настоящему изобретению, которые можно использовать для вставки молекулы полинуклеотида на сайт в хромосоме *S. avermitilis*, не относящийся к гену *aveC*, или для сохранения в эписоме.

В неограничивающем варианте осуществления изобретения вектор является вектором замещения гена, который можно использовать для введения мутированного аллеля *aveC* или его вырожденного варианта по настоящему изобретению в клетки штамма *S. avermitilis* с образованием новых штаммов *S. avermitilis*, клетки которых могут продуцировать авермектины класса 2:1 в меньшем соотношении по сравнению с клетками такого же штамма, которые экспрессируют только аллель *aveC* дикого типа. Такие векторы замещения гена могут быть созданы с использованием мутированных молекул полинуклеотидов, присутствующих в экспрессирующих векторах, рассмотренных в данном описании изобретения, таких как экспрессирующие векторы, рассмотренные в нижеследующем разделе 8.

Настоящее изобретение далее относится к векторам, которые можно использовать для введения мутированного аллеля *aveC* или его вырожденного варианта в клетки штамма *S. avermitilis* с целью создания новых штаммов клеток, продуцирующих авермектины в измененных количествах по сравнению с клетками такого же штамма, которые экспрессируют только аллель *aveC* дикого типа. В предпочтительном варианте осуществления изобретения увеличивается количество авермектинов, продуцируемых клетками. В конкретном варианте осуществления изобретения, не ограничивающем объем изобретения, такой вектор содержит сильный промотор, известный в данной области, например, сильный структурный промотор *ermE*, выделенный из *Saccharopolyspora erythraea*, который расположен сверху от открытой рамки считывания *aveC* и функционально связан с указанной рамкой. Такие векторы можно создать способами, описанными в патенте США № 6248579, используя мутированный аллель *aveC* плазмиды pSE189.

Настоящее изобретение относится к векторам замещения гена, которые пригодны для инактивации гена *aveC* в штамме *S. avermitilis* дикого типа. В неограничивающем варианте осуществления изобретения такие векторы замещения гена могут быть созданы с использованием мутированной молекулы полинуклеотида, находящейся в плазмиде pSE180 (ATCC 209605), которая рассмотрена в нижеследующем разделе 8.1 (фигура 3). Настоящее изобретение далее относится к векторам замещения гена, которые содержат молекулу полинуклеотида, имеющую нуклеотидные последовательности, которые в естественном состоянии фланкируют ген *aveC* *in situ* в хромосоме *S. avermitilis*,

включая последовательности, фланкирующие нуклеотидные последовательности, показанные на фигуре 1 (SEQ ID No.1), причем указанные векторы можно использовать для удаления открытой рамки считывания *aveC* *S. avermitilis*.

Настоящее изобретение далее относится к клетке-хозяину, содержащей молекулу

5 полинуклеотида или рекомбинантный вектор по настоящему изобретению. Клетка-хозяин может быть любой прокариотической или эукариотической клеткой, которую можно использовать в качестве хозяина для молекулы полинуклеотида или рекомбинантного вектора. В предпочтительном варианте осуществления изобретения клетка-хозяин является бактериальной клеткой. В более предпочтительном варианте осуществления изобретения клетка-хозяин является клеткой *Streptomyces*. В наиболее предпочтительном варианте осуществления изобретения клетка-хозяин является клеткой *Streptomyces avermitilis*.

Настоящее изобретение далее относится к способу получения нового штамма

15 *Streptomyces avermitilis*, который включает (i) мутирование аллеля *aveC* в клетке штамма *S. avermitilis*, вызывающее комбинацию замен аминокислот в продукте гена *AveC*, или (ii) введение в клетку штамма *S. avermitilis* мутированного аллеля *aveC* или его вырожденного варианта, кодирующего продукт гена *AveC*, содержащий комбинацию замен аминокислот, выбираемую из группы, включающей пункты (a)-(be) приведенного выше списка.

20 Настоящее изобретение далее относится к способу получения нового штамма *S. avermitilis*, который включает (i) мутирование аллеля *aveC* в клетке штамма *S. avermitilis*, вызывающее комбинацию замен аминокислот в продукте гена *AveC*, или (ii) введение в клетку штамма *S. avermitilis* мутированного аллеля *aveC* или его вырожденного варианта, кодирующего продукт гена *AveC*, включающий комбинацию замен аминокислот, благодаря чему клетки, содержащие мутированный аллель *aveC* или его вырожденный вариант, могут продуцировать авермектины циклогексил B2 : циклогексил B1 в соотношении 0,35:1 или меньше. В неограничивающем варианте осуществления изобретения мутированный аллель *aveC* или его вырожденный вариант кодирует продукт гена *AveC*, содержащий комбинацию замен аминокислот, выбираемую из группы, включающей пункты (a)-(be) приведенного выше списка.

30 В предпочтительном варианте осуществления изобретения соотношение авермектинов циклогексил B2 : циклогексил B1 составляет примерно 0,30:1 или меньше. В неограничивающем варианте осуществления изобретения мутированный аллель *aveC* или его вырожденный вариант кодирует продукт гена *AveC*, содержащий комбинацию замен аминокислот, выбираемую из группы, включающей пункты (f)-(be) приведенного выше списка.

В более предпочтительном варианте осуществления изобретения соотношение авермектинов циклогексил B2 : циклогексил B1 составляет примерно 0,25:1 или меньше. В неограничивающем варианте осуществления изобретения мутированный аллель *aveC* или его вырожденный вариант кодирует продукт гена *AveC*, содержащий комбинацию замен аминокислот, выбираемую из группы, включающей пункты (w)-(be) приведенного выше списка.

40 В более предпочтительном варианте осуществления изобретения соотношение авермектинов циклогексил B2 : циклогексил B1 составляет примерно 0,20:1 или меньше. В неограничивающем варианте осуществления изобретения мутированный аллель *aveC* или его вырожденный вариант кодирует продукт гена *AveC*, содержащий комбинацию замен аминокислот, выбираемую из группы, включающей пункты (ao)-(be) приведенного выше списка.

Настоящее изобретение далее относится к способу получения нового штамма

50 *Streptomyces avermitilis*, который включает (i) мутирование аллеля *aveC* в клетке штамма *S. avermitilis*, вызывающее комбинацию замен аминокислот в продукте гена *AveC*, или (ii) введение в клетку штамма *S. avermitilis* мутированного аллеля *aveC* или его вырожденного варианта, кодирующего продукт гена *AveC*, содержащий комбинацию замен

аминокислот, выбираемую из группы, включающей пункты (bf) и (bg). В предпочтительном варианте осуществления изобретения клетки *S. avermitilis*, содержащие такой мутированный аллель *aveC* или его вырожденный вариант, могут продуцировать авермектины циклогексил B2 : циклогексил B1 в соотношении около 0,40:1 или меньше.

5 В результате мутирования аллеля *aveC* в клетке или введения в клетку мутированного аллеля *aveC* или его вырожденного варианта в соответствии с вышеуказанными пунктами получают новый штамм *S. avermitilis*.

Настоящее изобретение далее относится к клетке вида из рода *Streptomyces*, которая содержит мутированный аллель *aveC* или его вырожденный вариант, кодирующий продукт гена *AveC*, содержащий комбинацию замен аминокислот, выбираемую из пунктов (a)-(be) 10 приведенного выше списка. В предпочтительном варианте осуществления изобретения вид из рода *Streptomyces* является видом из рода *S. avermitilis*.

Настоящее изобретение далее относится к клетке *S. avermitilis*, способной продуцировать авермектины циклогексил B2 : циклогексил B1 в соотношении 0,35:1 или 15 меньше. В неограничивающем варианте осуществления изобретения указанная клетка содержит мутированный аллель *aveC* или его вырожденный вариант, кодирующий продукт гена *AveC*, содержащий комбинацию замен аминокислот, выбираемую из группы, включающей пункты (a)-(be) приведенного выше списка.

В предпочтительном варианте осуществления изобретения соотношение авермектинов циклогексил B2 : циклогексил B1 составляет примерно 0,30:1 или меньше. В 20 неограничивающем варианте осуществления изобретения указанная клетка содержит мутированный аллель *aveC* или его вырожденный вариант, кодирующий продукт гена *AveC*, содержащий комбинацию замен аминокислот, выбираемую из группы, включающей пункты (f)-(be) приведенного выше списка.

В более предпочтительном варианте осуществления изобретения соотношение авермектинов циклогексил B2 : циклогексил B1 составляет примерно 0,25:1 или меньше. В 25 неограничивающем варианте осуществления изобретения указанная клетка содержит мутированный аллель *aveC* или его вырожденный вариант, кодирующий продукт гена *AveC*, содержащий комбинацию замен аминокислот, выбираемую из группы, включающей пункты (w)-(be) приведенного выше списка.

В более предпочтительном варианте осуществления изобретения соотношение авермектинов циклогексил B2 : циклогексил B1 составляет примерно 0,20:1 или меньше. В 30 неограничивающем варианте осуществления изобретения указанная клетка содержит мутированный аллель *aveC* или его вырожденный вариант, кодирующий продукт гена *AveC*, содержащий комбинацию замен аминокислот, выбираемую из группы, включающей пункты (ao)-(be) приведенного выше списка.

Настоящее изобретение далее относится к клетке вида из рода *Streptomyces*, содержащей мутированный аллель *aveC* или его вырожденный вариант, кодирующий продукт гена *AveC*, содержащий комбинацию замен аминокислот, выбираемую из группы, 40 включающей пункты (bf) и (bg) приведенного выше списка. В предпочтительном варианте осуществления изобретения вид из рода *Streptomyces* является видом из рода *S. avermitilis*. В более предпочтительном варианте осуществления изобретения указанная клетка является клеткой *S. avermitilis*, способной продуцировать авермектины циклогексил B2:циклогексил B1 в соотношении около 0,40:1 или меньше.

45 Хотя все вышеуказанные мутации могут присутствовать в клетках по настоящему изобретению во внехромосомном элементе, таком как плазмида, желательно, чтобы такие мутации находились в *aveC*-кодирующей последовательности, встроенной в хромосому *S. avermitilis*, и предпочтительно, хотя и необязательно, на сайте нативного аллеля *aveC*.

Такие новые штаммы клеток пригодны для крупномасштабного производства 50 коммерчески необходимых авермектинов, таких как дорамектин.

Настоящее изобретение далее относится к способу получения авермектинов, который включает культивирование клеток *S. avermitilis* по настоящему изобретению в культуральных средах в условиях, стимулирующих или индуцирующих продуцирование

авермектинов, и выделение указанных авермектинов из культуры. В предпочтительном варианте осуществления изобретения клетки, используемые в данном способе, продуцируют авермектины циклогексил В2 : циклогексил В1 в соотношении 0,35:1 или меньше, более предпочтительно в соотношении около 0,30:1 или меньше, еще

5 предпочтительнее в соотношении около 0,25:1 или меньше и наиболее предпочтительно в соотношении около 0,20:1 или меньше.

В предпочтительном варианте осуществления изобретения клетки, продуцирующие авермектины циклогексил В2 : циклогексил В1 в соотношении 0,35:1 или меньше, содержат мутированный аллель *aveC* или его вырожденный вариант, кодирующий продукт гена *AveC*,
10 содержащий комбинацию замен аминокислот, выбираемую из группы, включающей пункты (a)-(be) приведенного выше списка.

В более предпочтительном варианте осуществления изобретения клетки, продуцирующие авермектины циклогексил В2 : циклогексил В1 в соотношении около 0,30:1 или меньше, содержат мутированный аллель *aveC* или его вырожденный вариант,
15 кодирующий продукт гена *AveC*, содержащий комбинацию замен аминокислот, выбираемую из группы, включающей пункты (f)-(be) приведенного выше списка.

В более предпочтительном варианте осуществления изобретения, клетки, продуцирующие авермектины циклогексил В2 : циклогексил В1 в соотношении около 0,25,1 или меньше, содержат мутированный аллель *aveC* или его вырожденный вариант,
20 кодирующий продукт гена *AveC*, содержащий комбинацию замен аминокислот, выбираемую из группы, включающей пункты (w)-(be) приведенного выше списка.

В более предпочтительном варианте осуществления изобретения клетки, продуцирующие авермектины циклогексил В2 : циклогексил В1 в соотношении около 0,20:1 или меньше, содержат мутированный аллель *aveC* или его вырожденный вариант,
25 кодирующий продукт гена *AveC*, содержащий комбинацию замен аминокислот, выбираемую из группы, включающей пункты (ao)-(be) приведенного выше списка.

В другом варианте осуществления изобретения клетки продуцируют авермектины циклогексил В2 : циклогексил В1 в соотношении около 0,40:1 или меньше и содержат мутированный аллель *aveC* или его вырожденный вариант, кодирующий продукт гена *AveC*,
30 содержащий комбинацию замен аминокислот, выбираемую из группы, включающей пункты (bf) и (bg) приведенного выше списка.

При осуществлении способа по данному изобретению достигается более высокая эффективность получения коммерчески ценных авермектинов, таких как дорамектин.

Настоящее изобретение далее относится к композиции авермектинов циклогексил В2 :
35 циклогексил В1, продуцированной клетками *Streptomyces avermitilis* в культуральной среде, используемой для культивирования указанных клеток, в которой соотношение авермектинов циклогексил В2 : циклогексил В1 составляет примерно 0,35:1 или меньше, предпочтительно около 0,30:1 или меньше, более предпочтительно около 0,25:1 или меньше и наиболее предпочтительно около 0,20:1 или меньше. В конкретном варианте
40 осуществления изобретения композицию авермектинов циклогексил В2 : циклогексил В1 продуцируют клетки штамма *S. avermitilis*, которые экспрессируют мутированный аллель *aveC* или его вырожденный вариант, кодирующий генный продукт, в результате чего уменьшается соотношение авермектинов циклогексил В2 : циклогексил В1, продуцируемых указанными клетками, по сравнению к клетками такого же штамма *S. avermitilis*, не
45 содержащими мутированный аллель *aveC* и экспрессирующими только аллель *aveC* дикого типа.

В предпочтительном варианте осуществления изобретения, в котором указанная композиция включает авермектины циклогексил В2 : циклогексил В1 в соотношении 0,35:1 или меньше, данную композицию продуцируют клетки, содержащие мутированный аллель
50 *aveC* или его вырожденный вариант, кодирующий продукт гена *AveC*, содержащий комбинацию замен аминокислот, выбираемую из группы, включающей пункты (a)-(be) приведенного выше списка.

В более предпочтительном варианте осуществления изобретения, в котором указанная

композиция включает авермектины циклогексил В2 : циклогексил В1 в соотношении около 0,30:1 или меньше, данную композицию продуцируют клетки, содержащие мутированный аллель aveC или его вырожденный вариант, кодирующий продукт гена AveC, содержащий комбинацию замен аминокислот, выбираемую из группы, включающей пункты (f)-(be)

5 приведенного выше списка.

В более предпочтительном варианте осуществления изобретения, в котором указанная композиция включает авермектины циклогексил В2 : циклогексил В1 в соотношении около 0,25:1 или меньше, данную композицию продуцируют клетки, содержащие мутированный аллель aveC или его вырожденный вариант, кодирующий продукт гена AveC, содержащий комбинацию замен аминокислот, выбираемую из группы, включающей пункты (w)-(be)

10 приведенного выше списка.

В более предпочтительном варианте осуществления изобретения, в котором указанная композиция включает авермектины циклогексил В2 : циклогексил В1 в соотношении около 0,20:1 или меньше, данную композицию продуцируют клетки, содержащие мутированный аллель aveC или его вырожденный вариант, кодирующий продукт гена AveC, содержащий комбинацию замен аминокислот, выбираемую из группы, включающей пункты (ao)-(be)

15 приведенного выше списка.

Настоящее изобретение далее относится к композиции авермектинов циклогексил В2 : циклогексил В1, продуцированной клетками *Streptomyces avermitilis* в культуральной среде, используемой для культивирования указанных клеток, в которой соотношение авермектинов циклогексил В2 : циклогексил В1 составляет примерно 0,40:1, а также клетками, содержащими мутированный аллель aveC или его вырожденный вариант, кодирующий продукт гена AveC, содержащий комбинацию замен аминокислот, выбираемую из группы, включающей пункты (bf) и (bg) приведенного выше списка.

20

Хотя желательно, чтобы новая композиция авермектинов находилась в культуральной среде, используемой для культивирования клеток, например, в частично или полностью истощенной ферментационной культуральной среде, альтернативно композиция авермектинов может быть частично или по существу полностью очищена от культуральной среды известными биохимическими методами очистки, такими как осаждение сульфатом аммония, диализ, вытеснительное фракционирование, ионообменная хроматография, ВЭЖХ и т.д.

25

Помимо получения новых штаммов *S. avermitilis*, содержащих клетки, способные продуцировать авермектины циклогексил В2 : циклогексил В1 в меньших соотношениях, объектом настоящего изобретения являются дополнительные мутации, вводимые в клетки *S. avermitilis* для улучшения характеристик продуцирования авермектинов. В неограничивающем варианте осуществления изобретения клетки по настоящему изобретению могут включать модификации, повышающие уровни продуцирования авермектинов. В одном варианте осуществления изобретения такие клетки получают в результате (i) мутирования аллеля aveC в клетке *S. avermitilis* или (ii) введения мутированного аллеля aveC или его вырожденного варианта в клетки штамма *S. avermitilis*, при этом экспрессия мутированного аллеля вызывает увеличение количества авермектинов, продуцируемых клетками штамма *S. avermitilis*, экспрессирующими мутированный аллель aveC, по сравнению с клетками такого же штамма, экспрессирующими только аллель aveC дикого типа, и последующего отбора

35

трансформированных клеток, продуцирующих авермектины в большем количестве по сравнению с клетками такого же штамма, экспрессирующими только аллель aveC дикого типа. Например, аллель aveC можно модифицировать так, чтобы он включал сильный промотор, например сильный структурный промотор ermE, выделенный из *Saccharopolyspora erythraea*, расположенный сверху от открытой рамки считывания aveC и функционально связанный с указанной рамкой считывания. В другом варианте осуществления изобретения одну или несколько мутаций можно ввести в гены aveR1 и/или aveR2 *S. avermitilis*, в результате чего увеличивается продуцирование авермектинов, как это описано в патенте США № 6197591, выданном Stutzman-Engwall et al. 6 марта

40

45

50

2001 г.

5.4. Применение авермектинов

Авермектины являются весьма активными противопаразитарными средствами, применяемыми в качестве антигельминтных средств, эктопаразитоцидов, инсектицидов и акарицидов. Соединения авермектинов, полученные способами по настоящему изобретению, пригодны для любых вышеуказанных целей. Например, соединения авермектинов, полученные по настоящему изобретению, можно использовать для лечения разных заболеваний или нарушений у человека, в частности, заболеваний или нарушений, вызванных паразитарными инфекциями. См., например, Ikeda and Omura, 1997, Chem. Rev. 97(7):2591-2609. В частности, соединения авермектинов, полученные по настоящему изобретению, можно эффективно использовать для лечения разных заболеваний или нарушений, вызываемых эндопаразитами, такими как паразитарные нематоды, которые могут инфицировать человека, домашних животных, свиней, овец, домашнюю птицу, лошадей или крупный рогатый скот.

В частности, соединения авермектинов, полученные по настоящему изобретению, эффективно воздействуют на нематоды, инфицирующие человека, а также на нематоды, инфицирующие животных разных видов. Указанные нематоды включают желудочно-кишечных паразитов, таких как *Ancylostoma*, *Necator*, *Ascaris*, *Strongyloides*, *Trichinella*, *Capillaria*, *Trichuris*, *Enterobius*, *Dirofilaria*, паразитов, обнаруживаемых в крови и других тканях или органах, таких как филярия, и паразитов, вызывающих острые кишечные расстройства, таких как *Strongyloides* и *Trichinella*.

Соединения авермектинов, полученные по настоящему изобретению, пригодны также для лечения эктопаразитарных инфекций, включающих, например, инвазию млекопитающих и птиц членистоногими, в частности клещами, вшами, блохами, падальными мухами, жалящими насекомыми или мигрирующими личинками двукрылых насекомых, которые могут поражать крупный рогатый скот и лошадей наряду с прочими животными.

Соединения авермектинов, полученные по настоящему изобретению, можно также использовать в качестве инсектицидов против домашних паразитов, таких как, например, тараканы, платяная моль, кожеед и комнатная муха, а также против вредителей, портящих запасы зерна и сельскохозяйственные растения, которые включают наряду с прочими вредителями клещика паутиного, тлю, гусениц и прямокрылых насекомых, таких как саранча.

Соединения авермектина, полученные по настоящему изобретению, можно использовать для лечения таких животных, как овцы, крупный рогатый скот, лошади, олени, козы, свиньи, птицы, включая домашнюю птицу, собаки и кошки.

Соединение авермектина, полученное по настоящему изобретению, вводят в виде препарата, соответствующего конкретному способу введения, определенному виду животного, нуждающегося в лечении, и паразитам или насекомым, подлежащим уничтожению. При использовании в качестве паразитицида соединение авермектина, полученное по настоящему изобретению, можно вводить перорально в виде капсулы, болюса, таблетки или жидкости или альтернативно можно вводить в виде обливания, инъекции или имплантата. Такие препараты получают обычным способом в соответствии со стандартной практикой, принятой в ветеринарии. Так, капсулы, болюсы или таблетки можно получить, смешивая активный ингредиент с приемлемым тонко измельченным разбавителем или носителем, дополнительно содержащим вещество, улучшающее распадаемость, и/или связывающее вещество, такое как крахмал, лактоза, тальк, стеарат магния и т.д. Смачивающий препарат можно получить, диспергируя активный ингредиент в водном растворе с диспергирующим или смачивающим агентом и т.д. Инъекционные препараты можно получить в виде стерильного раствора, который может содержать другие вещества, такие как, например, соли и/или глюкоза, в количестве, достаточном для получения изотонического раствора по отношению к крови.

Такие препараты могут содержать разное количество активного соединения в

зависимости от состояния нуждающегося субъекта или вида животного, подлежащего лечению, тяжести заболевания, типа инфекции и массы тела хозяина. Доза активного соединения, предназначенная для перорального введения, обычно составляет от около 0,001 до 10 мг/кг массы тела нуждающегося субъекта или животного при введении в виде

5 однократной дозы или отдельных доз в течение 1-5 дней. Однако в некоторых случаях могут быть необходимы более высокие или более низкие дозы, определяемые лечащим врачом или ветеринаром на основании клинических симптомов.

В качестве альтернативы соединение авермектина, полученное по настоящему изобретению, можно вводить вместе с кормом для животных, и для указанной цели может

10 быть получена концентрированная кормовая добавка или премикс, предназначенные для смешивания с обычным кормом для животных.

При использовании в качестве инсектицида и для уничтожения сельскохозяйственных вредителей соединение авермектина, полученное по настоящему изобретению, можно применять в виде раствора для опрыскивания, пылевидного препарата, эмульсии и

15 подобных препаратов в соответствии с обычной сельскохозяйственной практикой.

6. Пример. Ферментация *Streptomyces avermitilis* и анализ авермектинов B2:B1

Штаммы, в которых отсутствует 2-кетокислота-дегидрогеназа с разветвленной цепью и 5-О-метилтрансфераза, не продуцируют авермектины без добавления в ферментационную среду жирных кислот. Данный пример показывает, что в таких мутантах можно получить

20 авермектины B2:B1 в разных соотношениях, если инициировать биосинтез в присутствии разных жирных кислот.

6.1. Вещества и способы

Streptomyces avermitilis ATCC 53692 хранили при -70°C в виде цельного бульона, полученного в среде для посева, включающей: крахмал (Nadex, Laing National) - 20 г;

25 фармацевтическую среду (Trader's Protein, Memphis, TN) - 15 г; ардамин pH (Yeast Products Inc.) - 5 г; карбонат кальция - 1 г. Конечный объем доводили до 1 литра, добавляя водопроводную воду, pH доводили до 7,2, после чего среду обрабатывали в автоклаве при 121°C в течение 25 минут.

Два мл оттаявшей суспензии вышеуказанного препарата использовали для инокуляции

30 50 мл аналогичной среды, находящейся в колбе. Смесь инкубировали при 28°C в течение 48 часов в роторном шейкере со скоростью вращения 180 оборотов/мин, 2 мл бульона использовали для инокуляции 50 мл продуцирующей среды, находящейся в колбе, которая содержит: крахмал - 80 г; карбонат кальция - 7 г; фармацевтическую среду - 5 г; вторичный кислый фосфат калия - 1 г; сульфат магния - 1 г; глутаминовую кислоту - 0,6

35 г; гептагидрат сульфата железа - 0,01 г; сульфат цинка - 0,001 г; сульфат магния (II) - 0,001 г. Конечный объем доводили до 1 литра, добавляя водопроводную воду, pH доводили до 7,2, после чего среду обрабатывали в автоклаве при 121°C в течение 25 минут.

Разные субстраты на основе карбоновой кислоты (см. таблицу 1) растворяли в метаноле

40 и добавляли к ферментационному бульону через 24 часа после инокуляции до конечной концентрации 0,2 г/литр. Ферментационный бульон инкубировали в течение 14 дней при 28°C, затем бульон центрифугировали (2500 оборотов/мин в течение 2 минут) и супернатант декантировали. Дебрис мицелия экстрагировали ацетоном (15 мл) и дихлорметаном (30 мл), органическую фазу отделяли, фильтровали и упаривали досуха.

45 Остаток поглощали метанолом (1 мл) и анализировали методом ВЭЖХ в жидкостном хроматографе Hewlett-Packard 1090A, оснащенном сканирующим диодным детектором, настроенным на длину волны 240 нм. Использовали колонку Backman Ultrasphere C-18, 5 мкм, 4,6 мм × 25 см, находящуюся при температуре 40°C. В колонку инъецировали

50 двадцать пять мкл вышеуказанного раствора в метаноле. Элюирование производили линейным градиентом смеси метанол-вода от 80:20 до 95:5 в течение 40 минут со скоростью 0,85 мл/мин. Для калибровки чувствительности детектора использовали две стандартные концентрации авермектина циклогексил B1 и измеряли площадь под кривыми для авермектинов B2 и B1.

6.2. Результаты

Значения времени удерживания при выполнении ВЭЖХ, полученные для авермектинов В2 и В1, и соотношения 2:1 приведены в таблице 1.

Таблица 1			
		Время удерживания для ВЭЖХ (мин)	
		Соотношение	
Субстрат	В2	В1	В2:В1
4-Тетрагидропиранкарбоновая кислота	8,1	14,5	0,25
Изомасляная кислота	10,8	18,9	0,5
3-Фуровая кислота	7,6	14,6	0,62
S-(+)-2-метилмасляная кислота	12,8	21,6	1,0
Циклогексанкарбоновая кислота	16,9	26,0	1,6
3-Тиофенкарбоновая кислота	8,8	16,0	1,8
Циклопентанкарбоновая кислота	14,2	23,0	2,0
3-Трифторметилмасляная кислота	10,9	18,8	3,9
2-Метилпентановая кислота	14,5	24,9	4,2
Циклогептанкарбоновая кислота	18,6	29,0	15,0

Данные, приведенные в таблице 1, свидетельствуют о чрезвычайно широком диапазоне соотношений авермектинов В2:В1 в продукте, указывая на значительную разницу результатов дегидративного превращения соединений класса 2 в соединения класса 1 в зависимости от иницирующего звена в боковой цепи жирной кислоты. Полученные данные показывают, что изменение соотношений В2:В1 в результате перестройки белка AveC может быть специфическим для конкретных субстратов. Поэтому скрининг мутантов, характеризующихся изменением соотношения В2:В1, полученных при использовании определенного субстрата, необходимо производить в присутствии данного субстрата. В приведенных ниже примерах в качестве субстрата для скрининга использована циклогексанкарбоновая кислота. Однако данный субстрат был использован только в качестве примера его возможного применения, и объем настоящего изобретения не ограничен только указанным субстратом.

7. Пример. Выделение гена aveC

В данном примере описано выделение и исследование области хромосомы *Streptomyces avermitilis*, кодирующей продукт гена AveC. Как показано ниже, было установлено, что ген aveC может изменять соотношение продуцируемых авермектинов циклогексил В2 : циклогексил В1 (В2:В1).

7.1. Вещества и способы

7.1.1. Выращивание *Streptomyces* для выделения ДНК

Streptomyces выращивали нижеследующим способом. Единичные колонии *S. avermitilis* ATCC 31272 (изолят единичной колонии №2) выделяли в 1/2-кратной среде YPD-6, содержащей дрожжевой экстракт Difco - 5 г; бактопептон Difco - 5 г; декстрозу - 2,5 г; MOPS - 5 г; бакто-агар Difco - 15 г. Конечный объем доводили до 1 литра, добавляя дистиллированную воду, pH доводили до 7,0, после чего среду обрабатывали в автоклаве при 121°C в течение 25 минут.

Мицелий, выращенный в вышеуказанной среде, использовали для инокуляции 10 мл среды TSB (триптиказо-соевый бульон Difco - 30 г в 1 литре дистиллированной воды, обработанный в автоклаве при 121°C в течение 25 минут) в пробирке 25 мм × 150 мм, которую встряхивали (300 оборотов/мин) при 28°C в течение 48-72 часов.

7.1.2. Выделение хромосомной ДНК из *Streptomyces*

Аликвоты (0,25 мл или 0,5 мл) мицелия, выращенного вышеописанным способом, вводили в 1,5 мл микроцентрифужные пробирки и клетки концентрировали центрифугированием с ускорением 12000×g в течение 60 секунд. Супернатант декантировали и клетки вновь суспендировали в 0,25 мл буфера TSE (20 мл 1,5 М сахарозы, 2,5 мл 1 М трис-буфера с HCl, pH 8,0, 2,5 мл 1 М EDTA, pH 8,0 и 75 мл дистиллированной воды), содержащем 2 мг/мл лизоцима. Образцы инкубировали, встряхивая, при 37°C в течение 20 минут, вводили в аппарат для автоматического выделения нуклеиновой кислоты AutoGen 540™ (Integrated Separation Systems, Natick,

МА) и выделяли геномную ДНК, используя программу Cycle 159 (программное обеспечение для оборудования), в соответствии с инструкциями изготовителя.

Альтернативно, 5 мл мицелия вводили в пробирку 17 мм × 100 мм, клетки концентрировали центрифугированием со скоростью 3000 оборотов/мин в течение 5 минут и удаляли супернатант. Клетки вновь суспендировали в 1 мл буфера TSE, концентрировали центрифугированием со скоростью 3000 оборотов/мин в течение 5 минут и удаляли супернатант. Клетки вновь суспендировали в 1 мл буфера TSE, содержащего 2 мг/мл лизоцима, и инкубировали, встряхивая, при 37°C в течение 30-60 минут. После окончания инкубации добавляли 0,5 мл 10% раствора додецилсульфата натрия (SDS) и инкубировали клетки при 37°C до окончания лизиса. Лизат инкубировали при 65°C в течение 10 минут, охлаждали до комнатной температуры, вводили в две 1,5 мл пробирки Эппендорфа и экстрагировали 1 раз 0,5 мл смеси фенол/хлороформ (50% фенола, предварительно уравновешенного 0,5М трис-буфера, pH 8,0; 50% хлороформа). Водную фазу удаляли и экстрагировали 2-5 раз смесью хлороформ : изоамиловый спирт (24:1). ДНК осаждали, для чего добавляли 1/10 объема 3М раствора ацетата натрия, pH 4,8, инкубировали смесь на льду в течение 10 минут, центрифугировали смесь со скоростью 15000 оборотов/мин при 5°C в течение 10 минут и переносили супернатант в чистую пробирку, в которую добавляли 1 объем изопропанола. Смесь супернатанта с изопропанолом инкубировали на льду в течение 20 минут, центрифугировали со скоростью 15000 оборотов/мин в течение 20 минут при 5°C, супернатант удаляли и осадок ДНК промывали 1 раз 70% этанолом. Затем осадок сушили и ДНК вновь суспендировали в буфере TE (10 mM трис-буфера, 1 mM EDTA, pH 8,0).

7.1.3. Выделение плазмидной ДНК из *Streptomyces*

Аликвоту (1,0 мл) мицелия вводили в 1,5 мл микроцентрифужные пробирки и клетки концентрировали центрифугированием с ускорением 12000×g в течение 60 секунд. Супернатант декантировали, клетки вновь суспендировали в 1,0 мл 10,3% раствора сахарозы, концентрировали центрифугированием с ускорением 12000×g в течение 60 секунд и супернатант декантировали. Клетки вновь суспендировали в 0,25 мл буфера TSE, содержащего 2 мг/мл лизоцима, инкубировали, встряхивая, при 37°C в течение 20 минут и вводили в аппарат для автоматического выделения нуклеиновой кислоты AutoGen 540™. Плазмидную ДНК выделяли, используя программу Cycle 106 (программное обеспечение для оборудования), в соответствии с инструкциями изготовителя.

Альтернативно 1,5 мл мицелия вводили в 1,5 мл микроцентрифужные пробирки и клетки концентрировали центрифугированием с ускорением 12000×g в течение 60 секунд. Супернатант декантировали, клетки вновь суспендировали в 1,0 мл 10,3% раствора сахарозы, концентрировали центрифугированием с ускорением 12000×g в течение 60 секунд и супернатант декантировали. Клетки вновь суспендировали в 0,5 мл буфера TSE, содержащего 2 мг/мл лизоцима, и инкубировали при 37°C в течение 15-30 минут. После окончания инкубации добавляли 0,25 мл щелочного раствора SDS (0,3 н. раствор в NaOH, 2% SDS) и клетки инкубировали при 55°C в течение 15-30 минут или до тех пор, пока раствор не становился прозрачным. К раствору ДНК добавляли ацетат натрия (0,1 мл, 3М, pH 4,8) и инкубировали на льду в течение 10 минут. Образцы ДНК центрифугировали со скоростью 14000 оборотов/мин в течение 10 минут при 5°C. Супернатант переносили в чистую пробирку, добавляли 0,2 мл смеси фенол : хлороформ (50% фенола : 50% хлороформа) и осторожно смешивали. Раствор ДНК центрифугировали со скоростью 14000 оборотов/мин в течение 10 минут при 5°C и верхний слой переносили в чистую пробирку Эппендорфа. Добавляли изопропанол (0,75 мл), раствор осторожно смешивали и инкубировали при комнатной температуре в течение 20 минут. Раствор ДНК центрифугировали со скоростью 14000 оборотов/мин в течение 15 минут при 5°C, супернатант удаляли и осадок ДНК промывали 70% этанолом, сушили и вновь суспендировали в буфере TE.

7.1.4. Выделение плазмидной ДНК из *E. coli*

Единичную трансформированную колонию *E. coli* инокулировали в 5 мл среды Луриа-Бертани (LB) (бактотриптон - 10 г, бактодрожжевой экстракт - 5 г и NaCl - 10 г в 1 литре дистиллированной H₂O, pH 7,0, обрабатывали в автоклаве при 121°C в течение 25 минут и добавляли 100 мкг/мл ампициллина). Культуру инкубировали в течение ночи и 1 мл аликвоту вводили в 1,5 мл микроцентрифужную пробирку. Образцы культуры вводили в аппарат для автоматического выделения нуклеиновой кислоты AutoGen 540™ и выделяли плазмидную ДНК, используя программу Cycle 3 (программное обеспечение для оборудования), в соответствии с инструкциями изготовителя.

7.1.5. Получение и трансформация протопластов *S. avermitilis*

Единичные колонии *S. avermitilis* выделяли в 1/2-кратной среде YPD-6. Мицелий использовали для инокуляции 10 мл среды TSB в пробирке 25 мм × 150 мм и инкубировали, встряхивая (300 оборотов/мин), при 28°C в течение 48 часов. Один мл мицелия использовали для инокуляции 50 мл среды YEME. Среда YEME содержит в одном литре: дрожжевой экстракт Difco - 3 г; бактопептон Difco - 5 г; солодовый экстракт Difco - 3 г; сахарозу - 300 г. Культуру обрабатывали в автоклаве при 121°C в течение 25 минут и добавляли 2,5 М раствор MgCl₂·6H₂O (отдельно обработанный в автоклаве при 121°C в течение 25 мин) - 2 мл и глицин (20%) (стерилизованный фильтрацией) - 25 мл.

Мицелий выращивали при 30°C в течение 48-72 часов и собирали в 50 мл центрифужной пробирке (Falcon) центрифугированием со скоростью 3000 оборотов/мин в течение 20 минут. Супернатант декантировали и мицелий вновь суспендировали в буфере Р, содержащем: сахарозу - 205 г; K₂SO₄ - 0,25 г; MgCl₂·6H₂O - 2,02 г; H₂O - 600 мл; K₂PO₄ (0,5%) - 10 мл; раствор микроэлементов* - 20 мл; CaCl₂·2H₂O (3,68%) - 100 мл и буфер MES (1,0 М, pH 6,5) - 10 мл. (*Раствор микроэлементов содержит в одном литре: ZnCl₂ - 40 мг; FeCl₃·6H₂O - 200 мг; CuCl₂·2H₂O - 10 мг; MnCl₂·4H₂O - 10 мг; Na₂B₄O₇·10H₂O - 10 мг; (NH₄)₆Mo₇O₂₄·4H₂O - 10 мг). Показатель pH доводили до 6,5, конечный объем доводили до 1 литра и среду фильтровали в горячем состоянии через фильтр с размером отверстий 0,45 мкм.

Мицелий осаждали со скоростью 3000 оборотов/мин в течение 20 минут, супернатант декантировали и мицелий вновь суспендировали в 20 мл буфера Р, содержащего 2 мг/мл лизоцима. Мицелий инкубировали, встряхивая, при 35°C в течение 15 минут и исследовали под микроскопом для определения степени образования протопластов. После окончания образования протопластов указанные протопласты центрифугировали со скоростью 8000 оборотов/мин в течение 10 минут. Супернатант удаляли и протопласты вновь суспендировали в 10 мл буфера Р. Протопласты центрифугировали со скоростью 8000 оборотов/мин в течение 10 минут, супернатант удаляли, протопласты вновь суспендировали в 2 мл буфера Р и примерно 1×10⁹ протопластов помещали в 2,0 мл криогенные сосуды (Nalgene).

Сосуд, содержащий 1×10⁹ протопластов, центрифугировали со скоростью 8000 оборотов/мин в течение 10 минут, супернатант удаляли и протопласты вновь суспендировали в 0,1 мл буфера Р. К протопластам добавляли 2-5 мкг трансформирующей ДНК, после чего сразу же добавляли 0,5 мл рабочего буфера Т. Основной буфер Т содержит: PEG-1000 (Sigma) - 25 г; сахарозу - 2,5 г; H₂O - 83 мл. Показатель pH доводили до 8,8, добавляя 1 н. раствор NaOH (стерилизованный фильтрацией), после чего основной буфер Т стерилизовали фильтрацией и хранили при 4°C. Рабочий буфер Т, полученный в день использования, содержал основной буфер Т - 8,3 мл; K₂PO₄ (4 мМ) - 1,0 мл; CaCl₂·2H₂O (5 М) - 0,2 мл и TES (1 М, pH 8) - 0,5 мл. Все компоненты рабочего буфера Т отдельно стерилизовали фильтрацией.

Через 20 секунд после добавления к протопластам буфера Т добавляли 1,0 мл буфера Р и протопласты центрифугировали со скоростью 8000 оборотов/мин в течение 10 минут. Супернатант декантировали и протопласты вновь суспендировали в 0,1 мл буфера Р. Затем протопласты культивировали на среде RM14, содержащей: сахарозу - 205 г; K₂SO₄ - 0,25 г; MgCl₂·6H₂O - 10,12 г; глюкозу - 10 г; касаминокислоты Difco - 0,1 г;

дрожжевой экстракт Difco - 5 г; агар на отваре из овсяной муки Difco - 3 г; бактоагар Difco - 22 г; дистиллированную H₂O - 800 мл. Раствор обрабатывали в автоклаве при 121°C в течение 25 минут. После обработки в автоклаве добавляли нижеследующие стерильные компоненты: K₂PO₄ (0,5%) - 10 мл; CaCl₂·2H₂O (5 M) - 5 мл; L-пролин (20%) - 15 мл; 5 буфер MES (1,0 M, pH 6,5) - 10 мл; раствор микроэлементов (аналогичный вышеуказанному) - 2 мл; циклогексими́д (25 мг/мл) - 40 мл и 1 н. раствор NaOH - 2 мл. На планшет наносили двадцать пять мл среды RM14 и сушили в течение 24 часов перед использованием.

10 Протопласты инкубировали в условиях 95% влажности при 30°C в течение 20-24 часов. Для отбора трансформантов, устойчивых к тиострептон, 1 мл покрывающего буфера, содержащего 125 мкг/мл тиострептона, равномерно распределяли поверх планшетов для регенерации RM14. Покрывающий буфер содержит в 100 мл: сахарозу - 10,3 г; раствор микроэлементов (аналогичный вышеуказанному) - 0,2 мл и буфер MES (1M, pH 6,5) - 1 мл. Протопласты инкубировали в условиях 95% влажности при 30°C в течение 15 7-14 дней до выявления колоний, устойчивых к тиострептон (Thio^r).

7.1.6. Трансформация протопластов *Streptomyces lividans*

В некоторых случаях для трансформации использовали протопласты *S. lividans* TK64 (предоставлены институтом John Innes Institute, Norwich, U.K.). В процессе исследования были использованы способы и композиции для выращивания, образования и 20 трансформации протопластов *S. lividans*, описанные в публикации Hopwood et al., 1985, Genetic Manipulation of *Streptomyces*, A Laboratory Manual, John Innes Foundation, Norwich, U.K. Плазмидную ДНК выделяли из трансформантов *S. lividans* в соответствии с описанием, приведенным в разделе 7.1.3 вышеуказанной публикации.

7.1.7. Анализ ферментации штаммов *S. avermitilis*

25 Мицелий *S. avermitilis*, выращиваемый в 1/2-кратной среде YPD-6 в течение 4-7 дней, инокулировали в пробирки 2,5 см × 15 см (1×6 дюймов), содержащие 8 мл предварительно полученной среды и два 5 мм стеклянных шарика. Предварительно полученная среда содержит: растворимый крахмал (крахмал, проваренный в жидком состоянии, или KOSO, Japan Corn Starch Co., Nagoya) - 20 г/л; фармацевтическую среду - 15 г/л; ардамин 30 pH - 5 г/л (Champlain Ind., Clifton, NJ); CaCO₃ - 2 г/л; двукратный объем жирных кислот с разветвленной цепью (bcfa), находящихся в среде в конечной концентрации, равной 50 ч/млн 2-(+)-метилмасляной кислоты, 60 ч/млн изомасляной кислоты и 20 ч/млн изовалериановой кислоты. Показатель pH доводили до 7,2 и среду обрабатывали в автоклаве при 121°C в течение 25 минут.

35 Пробирку встряхивали под углом 17° со скоростью 215 оборотов/мин при 29°C в течение 3 дней. 2 мл аликвоту посевной культуры использовали для инокуляции 25 мл продуцирующей среды в 300 мл колбе Эрленмейера, содержащей крахмал (крахмал, проваренный в жидком состоянии, или KOSO) - 160 г/л; нутрисой (Archer Daniels Midland, Decatur, IL) - 10 г/л; ардамин pH - 10 г/л; K₂HPO₄ - 2 г/л; MgSO₄·4H₂O - 2 г/л; 40 FeSO₄·7H₂O - 0,02 г/л; MnCl₂ - 0,002 г/л; ZnSO₄·7H₂O - 0,002 г/л; CaCO₃ - 14 г/л; двукратный объем жирных кислот с разветвленной цепью (bcfa) (аналогичных вышеуказанным) и циклогексанкарбоновую кислоту (CHC) (полученную в виде 20% раствора с pH 7,0) - 800 ч/млн. Показатель pH доводили до 6,9 и среду обрабатывали в автоклаве при 121°C в течение 25 минут. (Как указывалось выше, вместо CHC можно 45 использовать другие иницирующие звенья (см., например, таблицу 1).

После инокуляции колбу инкубировали, встряхивая со скоростью 200 оборотов/мин при 29°C в течение 12 дней. После окончания инкубации из колбы удаляли 2 мл образец, разводили его в 8 мл метанола, смешивали и смесь центрифугировали с ускорением 50 1250×g в течение 10 минут до образования дебриса. Супернатант анализировали методом ВЭЖХ, используя колонку Beckman Ultrasphere ODS (25 см × 4,6 мм внутренний диаметр) со скоростью потока 0,75 мл/мин, и производили исследование при оптической плотности 240 нм. В качестве подвижной фазы использовали смесь метанол/вода/ацетонитрил (86:

8,9:5,1).

7.1.8. Выделение генов PKS *S. avermitilis*

Была получена космидная библиотека хромосомной ДНК *S. avermitilis* (ATCC 31272, SC-2), которую гибридизировали с зондом на основе кетосинтазы (KS), полученным из фрагмента гена поликетидсинтазы (PKS) *Saccharopolyspora erythraea*. Получение космидных библиотек подробно описано в приведенной выше публикации Sambrook et al., 1989. Получение библиотек хромосомной ДНК *Streptomyces* подробно описано в приведенной выше публикации Hopwood et al., 1985. Космидные клоны, содержащие области, гибридизирующие с кетосинтазой, были идентифицированы в результате гибридизации с фрагментом NdeI/Eco47III длиной 2,7 т.п.о., выделенным из плазмиды рEX26 (любезно предоставленной д-ром Р. Leadlay, Cambridge, UK). Примерно 5 нг рEX25 гидролизovali, используя NdeI и Eco47III. Реакционную смесь помещали на 0,8% агарозный гель SeaPlaque GTG (FMC BioProducts, Rockland, ME). После выполнения электрофореза из геля вырезали фрагмент NdeI/Eco47III длиной 2,7 т.п.о. и методом Fast Protocol выделяли ДНК, используя GELazy™ компании Epicentre Technologies. Фрагмент NdeI/Eco47III длиной 2,7 т.п.о. метили [α -32P]dCTP (дезокситидин-5'-трифосфат тетра(триэтиламмония) в виде соли, [альфа-32P]-)(NEN-Dupont, Boston, MA), используя систему ник-трансляции BRL (BRL Life Technologies, Inc., Gaithersburg, MD), в соответствии с инструкциями поставщика. Обычную реакцию выполняли в 0,05 мл объеме. Затем добавляли 5 мкл терминирующего буфера и меченую ДНК отделяли от несвязанных нуклеотидов в колонке G-25 Sephadex Quick Spin™ (Boehringer Mannheim) в соответствии с инструкциями поставщика.

Методом гибридизации колоний было исследовано примерно 1800 космидных клонов. Было идентифицировано десять клонов, которые интенсивно гибридизировали с KS-зондом *Sacc. erythraea*. Колонии *E. coli*, содержащие космидную ДНК, выращивали в жидкой среде LB, после чего космидную ДНК выделяли из всех культур в аппарате для автоматического выделения нуклеиновой кислоты AutoGen 540™, используя программу Cycle 3 (программное обеспечение для оборудования), в соответствии с инструкциями изготовителя. Рестрикционное картирование эндонуклеазы и анализы гибридизации методом саузерн-блоттинга позволили выявить пять клонов, содержащих перекрывающиеся области в хромосоме. В результате анализа перекрывающихся космид и гибридизаций была создана рестрикционная карта геномного BamHI пяти космид *S. avermitilis* (то есть рSE65, рSE66, рSE67, рSE68, рSE69) (фигура 4).

7.1.9. Идентификация ДНК, модулирующей соотношения авермектинов B2:B1, и идентификация открытой рамки считывания aveC

Нижеследующие способы были использованы для исследования способности субклонированных фрагментов, выделенных из космидного клона рSE66, модулировать соотношения авермектинов B2:B1 в мутантах AveC. Плазмиду рSE66 (5 мкг) гидролизovali SacI и BamHI. Реакционную смесь помещали на 0,8% агарозный гель GTG SeaPlaque™ (FMC BioProducts), после выполнения электрофореза из геля вырезали фрагмент SacI/BamHI длиной 2,9 т.п.о. и методом Fast Protocol из геля удаляли ДНК, используя GELazy™ (Epicentre Technologies). Примерно 5 мкг шаттл-вектора рWHM3 (Vara et al., 1989, J. Bacteriol. 171:5872-5881) гидролизovali SacI и BamHI. Примерно 0,5 мкг вставки длиной 2,9 т.п.о. и 0,5 мкг гидролизованного вектора рWHM3 смешивали и инкубировали в течение ночи с 1 единицей лигазы (New England Biolabs, Inc., Beverly, MA) при 15°C в общем объеме, равном 20 мкл, в соответствии с инструкциями поставщика. После окончания инкубации 5 мкл лигированной смеси инкубировали при 70°C в течение 10 минут, охлаждали до комнатной температуры и использовали для трансформации компетентных клеток DH5 α *E. coli* (BRL) в соответствии с инструкциями изготовителя. Плазмидную ДНК выделяли из трансформантов, устойчивых к ампициллину, и наличие вставки SacI/BamHI длиной 2,9 т.п.о. подтверждали рестрикционным анализом. Указанная плаزمида получила название рSE119.

Полученные протопласты штамма 1100-SC38 *S. avermitilis* (штамм компании Pfizer) трансформировали плазмидой pSE119 в соответствии с описанием, приведенным в разделе 7.1.5. Штамм 1100-SC38 является мутантом, продуцирующим значительно больше авермектина циклогексил B2 по сравнению с авермектином циклогексил B1 при добавлении циклогексанкарбоновой кислоты (соотношение B2:B1 равно примерно 30:1). Плазмиду pSE119, использованную для трансформации протопластов *S. avermitilis*, выделяли из штамма GM2163 *E. coli* (предоставленного д-ром B.J. Bachmann, Curator, *E. coli* Genetic Stock Center, Yale University), штамма DM1 (BRL) *E. coli* или штамма TK64 *S. lividans*. Устойчивые к тиострептому трансформанты штамма 1100-SC38 выделяли и исследовали, анализируя методом ВЭЖХ продукты ферментации. Трансформанты штамма 1100-SC38 *S. avermitilis*, содержащие плазмиду pSE119, продуцировали авермектины циклогексил B2 : циклогексил B1 в измененном соотношении, равном примерно 3,7:1 (таблица 2).

Установив, что плазида pSE119 способна модулировать соотношение авермектинов B2:B1 в мутанте AveC, ДНК-вставку секвенировали. При помощи набора для выделения плазмидной ДНК (Qiagen, Valencia, CA), используемого в соответствии с инструкциями изготовителя, было выделено примерно 10 мкг плазмиды pSE119, которую секвенировали в автоматическом секвенаторе ДНК ABI 373A (Perkin Elmer, Foster City, CA). Данные, полученные для последовательности, были скомпонованы и отредактированы при помощи программы Genetic Computer Group (GCG, Madison, WI). Последовательность ДНК и открытая рамка считывания aveC показаны на фигуре 1 (SEQ ID No.1).

Новая плазида, получившая название pSE118, была создана следующим образом. Примерно 5 мкл pSE66 гидролизовали SphI и BamHI. Реакционную смесь помещали на 0,8% агарозный гель GTG SeaPlaque (FMC BioProducts), после выполнения электрофореза из геля вырезали фрагмент SphI/BamHI длиной 2,8 т.п.о. и методом Fast Protocol из геля выделяли ДНК, используя GELazy™ (Epicentre Technologies). Примерно 5 мкг шаттл-вектора pWHM3 гидролизовали SphI и BamHI. Примерно 0,5 мкг вставки длиной 2,8 т.п.о. и 0,5 мкг гидролизованного вектора pWHM3 смешивали и инкубировали в течение ночи с 1 единицей лигазы (New England Biolabs) при 15°C в общем объеме, равном 20 мкл, в соответствии с инструкциями поставщика. После окончания инкубации 5 мкл лигированной смеси инкубировали при 70°C в течение 10 минут охлаждали до комнатной температуры и использовали для трансформации компетентных клеток DH5α *E. coli* в соответствии с инструкциями изготовителя. Плазмидную ДНК выделяли из трансформантов, устойчивых к ампициллину, и наличие вставки SphI/BamHI длиной 2,8 т.п.о. подтверждали рестрикционным анализом. Указанная плазида получила название pSE118. ДНК-вставка в плазидах pSE118 и pSE119 перекрывается примерно 838 нуклеотидами (фигура 4).

Протопласты штамма 1100-SC38 *S. avermitilis* трансформировали плазмидой pSE118 вышеуказанным способом. Трансформанты, устойчивые к тиострептому, штамма 1100-SC38 выделяли и исследовали, анализируя методом ВЭЖХ продукты ферментации. У трансформантов штамма 1100-SC38 *S. avermitilis*, содержащих плазмиду pSE118, не были изменены соотношения авермектинов циклогексил B2:циклогексил B1 по сравнению со штаммом 1100-SC38 (таблица 2).

7.1.10. Амплификация гена aveC из хромосомной ДНК *S. avermitilis* методом PCR

Фрагмент длиной ~1,2 т.п.о., содержащий открытую рамку считывания aveC, выделяли из хромосомной ДНК *S. avermitilis* при помощи амплификаций методом PCR, используя затравки, созданные на основе полученной выше нуклеотидной последовательности aveC. Затравки для PCR были предоставлены компанией Genosys Biotechnologies, Inc. (Техас). Нижняя затравка представляла собой: 5'-TCACGAAACCGACACAC-3' (SEQ ID No.6); и верхняя затравка представляла собой: 5'-CATGATCGCTGAACCGAG-3' (SEQ ID No.7). Реакцию PCR выполняли с использованием полимеразы Deep Vent™ (New England Biolabs) в буфере, предоставленном изготовителем, и в присутствии 300 мкМ dNTP, 10% глицерина, 200 пмоль каждой затравки, 0,1 мкг матрицы и 2,5 единицы фермента в конечном объеме, равном 100 мкл, в термоблоке для проведения реакций Cetus компании Perkin-Elmer. Тепловой профиль первого цикла характеризовался температурой 95°C в

течение 5 минут (стадия денатурации), 60°C в течение 2 минут (стадия отжига) и 72°C в течение 2 минут (стадия удлинения). 24 последующих цикла имели аналогичный тепловой профиль за исключением того, что стадия денатурации была сокращена до 45 секунд и стадия отжига была сокращена до 1 минуты.

Продукт PCR подвергали электрофорезу в 1% агарозном геле, при этом была обнаружена одна полоса ДНК длиной ~1,2 т.п.о. Данную ДНК очищали от геля и лигировали с 25 нг линейного, дефосфорилированного вектора pCR-Blunt (Invetrogen) в молярном соотношении вектор:вставка, равном 1:10, в соответствии с инструкциями изготовителя. Лигированную смесь использовали для трансформации компетентных клеток *E. coli* One Shot™ (Invitrogen) в соответствии с инструкциями изготовителя. Плазмидную ДНК выделяли из трансформантов, устойчивых к ампициллину, и наличие вставки длиной ~1,2 т.п.о. подтверждали рестрикционным анализом. Данная плазида получила название pSE179.

ДНК-вставку из плазмиды pSE179 выделяли гидролизом BamHI/XbaI, отделяли электрофорезом, очищали от геля и лигировали с шаттл-вектором pWHM3, который также предварительно гидролизовали BamHI/XbaI, с достижением концентрации полной ДНК, равной 1 мкг, при молярном соотношении вектор : вставка, равном 1:5. Лигированную смесь использовали для трансформации компетентных клеток DH5α *E. coli* в соответствии с инструкциями изготовителя. Плазмидную ДНК выделяли из трансформантов, устойчивых к ампициллину, и наличие вставки длиной ~1,2 т.п.о. подтверждали рестрикционным анализом. Указанную плазмиду, которая получила название pSE186 (фигура 2, ATCC 209604), вводили в клетки DM1 *E. coli* и из трансформантов, устойчивых к ампициллину, выделяли плазмидную ДНК.

7.2. Результаты

Установлено, что фрагмент SacI/BamHI длиной 2,9 т.п.о., выделенный из плазмиды pSE119, при введении в штамм 1100-SC38 *S. avermitilis* значительно изменяет соотношение продуцируемых авермектинов B2:B1. Штамм 1100-SC38 *S. avermitilis* обычно характеризовался соотношением B2:B1, равным примерно 30:1, но в результате трансформации вектором, содержащим фрагмент SacI/BamHI длиной 2,9 т.п.о., соотношение авермектинов B2:B1 уменьшилось примерно до 3,7:1. Результаты анализа культур трансформантов после ферментации подтвердили наличие трансформирующей ДНК.

Фрагмент pSE119 длиной 2,9 т.п.о. секвенировали и идентифицировали открытую рамку считывания длиной ~0,9 т.п.о. (фигура 1) (SEQ ID No.1), включающую фрагмент PstI/SphI, который предварительно был мутирован с возможностью продуцирования только продуктов B2 (Ikeda et al., 1995, см. выше). Сравнение данной открытой рамки считывания или ее соответствующего выделенного полипептида с известными базами данных (GenEMBL, SWISS-PROT) не выявило какой-либо значительной гомологии с известными последовательностями ДНК или белка.

В таблице 2 приведены результаты анализа ферментации штамма 1100-SC38 *S. avermitilis*, трансформированного разными плазмидами.

Таблица 2		
Штамм <i>S. Avermitilis</i> (трансформирующая плазида)	Кол-во испытанных трансформантов	Среднее соотношение B2:B1
1100-SC38 (отсутствие плазмиды)	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. Создание мутантов AveC *S. Avermitilis*

В данном примере описано создание нескольких разных мутантов AveC *S. avermitilis* с использованием вышеописанных композиций и способов. Общее описание методов введения мутаций в ген *Streptomyces* дано в статье Kieser and Hopwood, 1991, Meth. Enzym. 204:430-458. Более подробно указанные методы описаны в статьях Anzai et al.,

1988, J. Antibiot. XLI(2):226-233 и Stutzman-Engwall et al., 1992, J. Bacteriol. 174(1):144-154. Указанные публикации полностью включены в данное описание в качестве ссылки.

8.1. Инактивация гена *aveC* *S. avermitilis*

5 Мутанты AveC, содержащие инактивированные гены *aveC*, были созданы несколькими способами, подробно описанными ниже.

В соответствии с первым способом фрагмент *SphI/PstI* длиной 640 п.о., находящийся внутри гена *aveC* плазмиды pSE119 (плазида, описанная в разделе 7.1.9.), заменяли геном *ermE* (ген устойчивости к эритромицину) из *Sacc. erytraea*. Ген *ermE* выделяли из
10 плазмиды pIJ4026 (предоставлена институтом John Innes Institute, Norwich, U.K.; см. также Bibb et al., 1985, Gene 41:357-368) путем гидролиза рестрикционными ферментами *BglII* и *EcoRI* с последующим выполнением электрофореза и очищали от геля. Полученный фрагмент длиной ~1,7 т.п.о. лигировали с плазмидой pGEM7Zf (Promega), которую гидролизовали *BamHI* и *EcoRI*, и лигированную смесь вводили в компетентные клетки DH5 α
15 *E. coli* в соответствии с инструкциями изготовителя. Плазмидную ДНК выделяли из трансформантов, устойчивых к ампициллину, и наличие вставки длиной ~1,7 т.п.о. подтверждали рестрикционным анализом. Данная плазида получила название pSE27.

Плазмиду pSE118 (описанную в разделе 7.1.9.) гидролизовали *SphI* и *BamHI*, гидролизат подвергали электрофорезу и вставку *SphI/BamHI* длиной ~2,8 т.п.о. очищали от геля.
20 Плазмиду pSE119 гидролизовали *PstI* и *EcoRI*, гидролизат подвергали электрофорезу и вставку *PstI/EcoRI* длиной ~1,5 т.п.о. очищали от геля. Шаттл-вектор pWHM3 гидролизовали *BamHI* и *EcoRI*. Плазмиду pSE27 гидролизовали *PstI* и *SphI*, гидролизат подвергали электрофорезу и вставку *PstI/SphI* длиной ~1,7 т.п.о. очищали от геля. Все четыре фрагмента (то есть фрагменты длиной ~2,8 т.п.о., ~1,5 т.п.о., ~7,2 т.п.о., ~1,7
25 т.п.о.) лигировали друг с другом методом четырехстороннего лигирования. Лигированную смесь вводили в компетентные клетки DH5 α *E. coli* в соответствии с инструкциями изготовителя. Плазмидную ДНК выделяли из трансформантов, устойчивых к ампициллину, и наличие правильной вставки подтверждали регистрикционным анализом. Данная плазида получила название pSE180 (фигура 3; ATCC 209605).

30 Плазмиду pSE180 вводили в клетки TK64 *S. lividans* и трансформированные колонии идентифицировали по устойчивости к тиострепτονу и эритромицину. Плазмиду pSE180 выделяли из *S. lividans* и использовали для трансформации протопластов *S. avermitilis*. Были идентифицированы четыре устойчивых к тиострепτονу трансформанта *S. avermitilis*, после чего полученные протопласты культивировали в неизбирательных условиях на среде
35 RM14. После регенерации протопластов единичные колонии исследовали на наличие устойчивости к эритромицину и отсутствие устойчивости к тиострепτονу, что свидетельствовало о встраивании в хромосому инактивированного гена *aveC* и утрату свободного репликона. Был идентифицирован один трансформант *Ermr* Thios, который получил название штамма SE180-11. Из штамма SE180-11 выделяли полную хромосомную
40 ДНК, гидролизовали рестрикционными ферментами *BamHI*, *HindIII*, *PstI* или *SpjI*, выделяли электрофорезом в 0,8% агарозном геле, переносили на найлоновые мембраны и гибридизировали с зондом *ermE*. Указанные анализы показали, что встраивание гена устойчивости *ermE* в хромосому и одновременная делеция фрагмента *PstI/SphI* длиной 640 п.о. происходили в результате двойного кроссинговера. Анализ продуктов ферментации
45 штамма SE180-11 методом ВЭЖХ показал отсутствие продуцирования нормальных авермектинов (фигура 5A).

В соответствии со вторым способом инактивации гена *aveC* из хромосомы штамма SE180-11 *S. avermitilis* удаляли ген *ermE* длиной 1,7 т.п.о., оставляя делецию
50 *PstI/SphI* длиной 640 п.о. в гене *aveC*. Плазида замещения гена была создана следующим образом: плазмиду pSE180 частично гидролизовали *XbaI* и фрагмент длиной ~11,4 т.п.о. очищали от геля. В полосе, соответствующей фрагменту длиной ~11,4 т.п.о., отсутствует ген устойчивости *ermE* длиной 1,7 т.п.о. Затем ДНК лигировали и вводили в клетки DH5 α *E. coli*. Плазмидную ДНК выделяли из трансформантов, устойчивых к

ампициллину, и наличие правильной вставки подтверждали рестрикционным анализом. Данную плазмиду, получившую название pSE184, вводили в DM1 *E. coli* и плазмидную ДНК выделяли из трансформантов, устойчивых к ампициллину. Данную плазмиду использовали для трансформации протопластов штамма SE180-11 *S. avermitilis*. Протопласты получали из устойчивых к тиострептонуту трансформантов штамма SE180-11 и помещали в виде единичных колоний на среду RM14. После регенерации протопластов единичные колонии исследовали на отсутствие устойчивости к эритромицину и устойчивости к тиострептонуту, что свидетельствовало о встраивании в хромосому инактивированного гена *aveC* и утрате свободного репликона, содержащего ген *ermE*. Был идентифицирован один трансформант *Erm^s Thio^s*, получивший название SE184-1-13. Анализ ферментации SE184-1-13 показал отсутствие продуцирования нормальных авермектинов и наличие у SE184-1-13 такого же профиля ферментации, что и у SE180-11.

В соответствии с третьим способом инактивации гена *aveC* в хромосомном гене *aveC* вызывали сдвиг рамки считывания, добавляя два остатка G после C в положении нуклеотида 471 при помощи PCR, в результате чего был создан сайт BspE1. Наличие сконструированного сайта BspE1 позволило обнаружить замену гена. Затравки для PCR, созданные с возможностью введения мутации со сдвигом рамки считывания в ген *aveC*, были предоставлены компанией Genosys Biotechnologies, Inc. Нижняя затравка представляла собой: 5'-GGTTCGGGATGCCGTTCTCG-3' (SEQ ID No.8), и верхняя затравка представляла собой: 5'-AACTCCGGT CGACTCCCCTTC-3' (SEQ ID No.9). Условия выполнения PCR были аналогичны описанным в разделе 7.1.10. Продукт PCR длиной 666 п.о. гидролизовали SphI с образованием двух фрагментов длиной соответственно 278 п.о. и 388 п.о. Фрагмент длиной 388 п.о. очищали от геля.

Плазмида замещения гена была создана следующим образом: шаттл-вектор pWHM3 гидролизовали EcoRI и BamHI. Плазмиду pSE119 гидролизовали BamHI и SphI, гидролизат подвергали электрофорезу и фрагмент длиной ~840 п.о. очищали от геля. Плазмиду pSE119 гидролизовали EcoRI и XmnI, гидролизат выделяли электрофорезом и фрагмент длиной ~1,7 т.п.о. очищали от геля. Все четыре фрагмента (то есть фрагменты длиной ~7,2 т.п.о., ~840 п.о., ~1,7 т.п.о. и 388 п.о.) лигировали друг с другом методом четырехстороннего лигирования. Лигированную смесь вводили в компетентные клетки DH5 α *E. coli*. Плазмидную ДНК выделяли из трансформантов, устойчивых к ампициллину, и наличие правильной вставки подтверждали рестрикционным анализом и анализом последовательности ДНК. Данную плазмиду, получившую название pSE185, вводили в DM1 *E. coli* и плазмидную ДНК выделяли из трансформантов, устойчивых к ампициллину. Указанную плазмиду использовали для трансформации протопластов штамма 1100-SC38 *S. avermitilis*. Устойчивые к тиострептонуту трансформанты штамма 1100-SC38 выделяли и исследовали, анализируя методом ВЭЖХ продукты ферментации.

Плазмида pSE185 существенно не изменяла соотношение авермектинов B2:B1 при введении в штамм 1100-SC38 *S. avermitilis* (таблица 2).

Плазмиду pSE185 использовали для трансформации протопластов *S. avermitilis* с получением мутации со сдвигом рамки считывания в хромосомном гене *aveC*. Протопласты получали из трансформантов, устойчивых к тиострептонуту, и культивировали в виде единичных колоний на среде RM14. После регенерации протопластов единичные колонии исследовали на отсутствие устойчивости к тиострептонуту. Из колоний, чувствительных к тиострептонуту, выделяли хромосомную ДНК и исследовали при помощи PCR на наличие мутации со сдвигом рамки считывания, встроенной в хромосому. Затравки для PCR, полученные на основе нуклеотидной последовательности *aveC*, были предоставлены компанией Genosys Biotechnologies, Inc. (Техас). Нижняя затравка для PCR представляла собой: 5'-GCAAGGATACGGGGACTAC-3' (SEQ ID No.10), верхняя затравка для PCR представляла собой: 5'-GAACCGACCGCCTGATAC-3' (SEQ ID No.11), и условия выполнения PCR были аналогичны описанным в разделе 7.1.10. Продукт PCR, содержащий 543 п.о., гидролизовали BspE1, в результате чего были получены три фрагмента длиной 368 п.о., 96 п.о. и 79 п.о., что свидетельствовало о встраивании в хромосому

инактивированного гена *aveC* и утрате свободного репликона.

Анализ ферментации мутантов *S. avermitilis*, содержащих мутацию со сдвигом рамки считывания в гене *aveC*, показал отсутствие продуцирования нормальных авермектинов, при этом указанные мутанты имели такой же профиль ферментации при анализе ВЭЖХ, что и штаммы SE180-11 и SE184-1-13. Был идентифицирован один трансформант Thio^s, получивший название штамма SE185-5a.

Кроме того, в гене *aveC* была создана мутация с заменой в положении нуклеотида 520 остатка G остатком A, в результате чего происходит замена кодона, кодирующего триптофан (W), в положении 116 терминирующим кодоном. Штамм *S. avermitilis* с указанной мутацией не продуцировал нормальные авермектины и имел такой же профиль ферментации, что и штаммы SE180-11, SE184-1-13 и SE185-5a.

Кроме того, в гене *aveC* были созданы мутации, в результате которых происходит замена: (i) остатка G остатком A в положении нуклеотида 970, что вызывает замену глицина (G) аспаратом (D) в положении аминокислоты 266, и (ii) остатка T остатком C в положении нуклеотида 996, что вызывает замену тирозина (Y) гистидином (H) в положении аминокислоты 275. Штамм *S. avermitilis* с указанными мутациями (G266D/Y275H) не продуцировал нормальные авермектины и имел такой же профиль ферментации, что и штаммы SE180-11, SE184-1-13 и SE185-5a.

Инактивация гена *aveC* *S. avermitilis* в мутантных штаммах SE180-11, SE184-1-13, SE185-5a и других полученных штаммах позволяет оценить влияние других мутаций в гене *aveC*. Плазмиду pSE186, содержащую копию гена *aveC* дикого типа, вводили в DM1 *E. coli* и плазмидную ДНК выделяли из трансформантов, устойчивых к ампициллину. Полученную ДНК pSE186 использовали для трансформации протопластов штамма SE180-11 *S. avermitilis*. Устойчивые к тиострепτονу трансформанты штамма SE180-11 выделяли, определяли у них наличие устойчивости к эритромицину и исследовали трансформанты Thio^r Erm^r, анализируя методом ВЭЖХ продукты ферментации. Наличие функционального гена *aveC* в трансформантах позволяло восстановить продуцирование нормальных авермектинов в штамме SE180-11 (фигура 5B).

8.2. Анализ мутаций в гене *aveC*, изменяющих соотношение авермектинов класса B2:B1

Как отмечалось выше, штамм SE180-11 *S. avermitilis*, содержащий неактивный ген *aveC*, дополнительно был трансформирован плазмидой, содержащей функциональный ген *aveC* (pSE186). Штамм SE180-11 также использовали в качестве штамма-хозяина для исследования других мутаций в гене *aveC* в соответствии с приведенным ниже описанием.

Хромосомную ДНК выделяли из штамма 1100-SC38 и использовали в качестве матрицы для амплификации гена *aveC* при помощи PCR. Открытую рамку считывания длиной 1,2 т.п.о. выделяли путем амплификации при помощи PCR, используя затравки, созданные на основе нуклеотидной последовательности *aveC*. Нижняя затравка имела SEQ ID No.6, и верхняя затравка имела SEQ ID No.7 (см. приведенный выше раздел 7.1.10). Условия выполнения PCR и субклонирования были аналогичны описанным в разделе 7.1.10. Анализ последовательности ДНК открытой рамки считывания длиной 1,2 т.п.о. показывает наличие мутации в гене *aveC*, вызывающей замену остатка C остатком T в положении нуклеотида 337, в результате чего происходит замена серина (S) фенилаланином (F) в положении аминокислоты 55. Ген *aveC*, содержащий мутацию S55F, субклонировали в векторе pWHM3 с образованием плазмиды, которая получила название pSE187 и была использована для трансформации протопластов штамма SE180-11 *S. avermitilis*. Устойчивые к тиострепτονу трансформанты штамма SE180-11 выделяли, определяли наличие устойчивости к эритромицину и исследовали трансформанты Thio^r Erm^r, анализируя методом ВЭЖХ продукты ферментации. Наличие гена *aveC*, кодирующего замену аминокислотного остатка 55 (S55F), позволяло восстановить продуцирование нормальных авермектинов в штамме SE180-11 (фигура 5C); однако соотношение авермектинов циклогексил B2 : циклогексил B1 составляло примерно 26:1 по сравнению со штаммом SE180-11, трансформированным плазмидой pSE186, в котором соотношение B2:B1 было равно примерно 1,6:1 (таблица 3), свидетельствуя о том, что одна мутация (S55F) модулирует количество продуцируемого

авермектина циклогексил B2 по отношению к авермектину циклогексил B1.

В гене aveC была идентифицирована другая мутация, вызывающая замену остатка G остатком A в положении нуклеотида 862, в результате чего происходит замена глицина (G) аспаратом (D) в положении аминокислоты 230. Штамм *S. avermitilis*, имеющий

5 указанную мутацию (G230D), продуцирует авермектины при соотношении B2:B1 около 30:1.

8.3. Мутации, уменьшающие соотношение авермектинов B2:B1

Несколько мутаций, уменьшающих количество продуцируемого авермектина циклогексил B2 по отношению к авермектину циклогексил B1, было получено описанным ниже способом.

10 Была идентифицирована мутация в гене aveC, которая вызывает замену остатка G остатком A в положении нуклеотида 588, в результате чего происходит замена аланина (A) треонином (T) в положении аминокислоты 139. Ген aveC, содержащий мутацию A139T, субклонировали в векторе pWHM3 с образованием плазмиды, которая получила название pSE188 и была использована для трансформации протопластов штамма SE180-11 *S.*
15 *avermitilis*. Устойчивые к тиострепτονу трансформанты штамма SE180-11 выделяли, определяли наличие устойчивости к эритромицину и исследовали трансформанты Thior Etmr, анализируя методом ВЭЖХ продукты ферментации. Наличие мутированного гена aveC, кодирующего замену аминокислотного остатка в положении 139 (A139T), позволяло восстановить продуцирование нормальных авермектинов в штамме SE180-11 (фигура 5D);
20 однако соотношение B2:B1 составляло примерно 0,94:1, показывая, что данная мутация уменьшает количество продуцируемого авермектина циклогексил B2 по отношению к авермектину циклогексил B1. Такой результат был весьма неожиданным, так как опубликованные данные, а также описанные выше результаты мутаций свидетельствовали только об инактивации гена aveC или более высоком продуцировании авермектина B2 по
25 отношению к авермектину B1 (таблица 3).

Так как мутация A139T изменяла соотношение B2:B1 в более благоприятном направлении для авермектина B1, была создана мутация, кодирующая треонин вместо серина в положении аминокислоты 138. Так, плазмиду pSE186 гидролизовали EcoRI и клонировали в pGEM3Zf (Promega), которую гидролизовали EcoRI. Данную плазмиду,
30 которая получила название pSE186a, гидролизовали ApaI и KpnI, фрагменты ДНК разделяли на агарозном геле и два фрагмента длиной ~3,8 т.п.о. и ~0,4 т.п.о. очищали от геля. ДНК-вставку длиной ~1,2 т.п.о., выделенную из плазмиды pSE186, использовали в качестве матрицы для PCR, служащей для замены одного основания в положении нуклеотида 585. Затравки для PCR, предназначенные для введения мутации в положение
35 нуклеотида 585, были предоставлены компанией Genosys Bioterchnologies, Inc. (Техас). Нижняя затравка для PCR представляла собой: 5'-GGGGGCGGGCCCCGGGTGCGGAGGCGGAAATGCCCCCTGGCGACG-3' (SEQ ID No.12) и верхняя затравка для PCR представляла собой: 5'-GGAACCGACCGCCTGATACA-3' (SEQ ID No.13). Реакцию PCR выполняли, используя набор для геномной PCR Advantage GC
40 (Clonetech Laboratories, Palo Alto, CA), в буфере, предоставленном изготовителем, в присутствии смеси 200 мкМ dNTP, 200 пмоль каждой затравки, 50 нг матричной ДНК, 1,0М GC-расплава и 1 единицы полимеразной смеси KlenTaq в конечном объеме 50 мкл. Тепловой профиль первого цикла характеризовался температурой 94°C в течение 1 минуты, затем 25 циклов при температуре 94°C в течение 30 секунд и 68°C в течение 2
45 минут; и 1 цикл при температуре 68°C в течение 3 минут. Продукт PCR длиной 295 п.о. гидролизовали ApaI и KpnI и выделяли фрагмент длиной 254 п.о., который отделяли электрофорезом и очищали от геля. Все три фрагмента (фрагменты длиной ~3,8 т.п.о., ~0,4 т.п.о. и 254 п.о.) лигировали друг с другом путем трехстороннего лигирования. Лигированную смесь вводили в компетентные клетки DH5α *E. coli*.
50 Плазмидную ДНК выделяли из трансформантов, устойчивых к ампициллину, и наличие правильной вставки подтверждали рестрикционным анализом. Данная плазида получила название pSE198.

Плазмиду pSE198 гидролизовали EcoRI, клонирования в векторе pWHM3, который

предварительно гидролизировали EcoRI, и вводили в клетки DH5 α E. coli. Плазмидную ДНК выделяли из трансформантов, устойчивых к ампициллину, и наличие правильной вставки подтверждали рестрикционным анализом и анализом последовательности ДНК. Указанную плазмидную ДНК вводили в DM1 E. coli, плазмидную ДНК выделяли из трансформантов, устойчивых к ампициллину, и наличие правильной вставки подтверждали рестрикционным анализом. Данную плазмиду, получившую название pSE199, использовали для трансформации протопластов штамма SE180-11 S. avermitilis. Устойчивые к тиострептон трансформанты штамма SE180-11 выделяли, определяли наличие устойчивости к эритромицину и исследовали трансформанты Thio^r Erm^r, анализируя методом ВЭЖХ продукты ферментации. Наличие мутированного гена aveC, кодирующего замену аминокислотного остатка 138 (S138T), позволяло восстановить продуцирование нормальных авермектинов в штамме SE180-11; однако соотношение B2:B1 было равно 0,88:1, из чего следует, что данная мутация уменьшает количество продуцируемого авермектина циклогексил B2 по отношению к авермектину циклогексил B1 (таблица 3). Данное соотношение B2:B1 даже ниже соотношения 0,94:1, имеющего место в случае вышеописанной мутации A139T, получаемой при трансформации штамма SE180-11 плазмидой pSE188.

Другая мутация была создана для введения треонина в положения аминокислот 138 и 139. ДНК-вставку длиной ~1,2 т.п.о., выделенную из плазмиды pSE186, использовали в качестве матрицы для PCR. Затравки для PCR, предназначенные для введения мутаций в положения нуклеотидов 585 и 588, были предоставлены компанией Genosys Biotechnologies, Inc. (Техас). Нижняя затравка для pCR представляла собой:

5'-GGGGGCGGGCCCGGGTGC GGAGGCGGAAATGCCGCTGGCGACGACC-3' (SEQ ID No.14), и верхняя затравка для PCR представляла собой: 5'-GGAACATCACGGCATTACCC-3' (SEQ ID No.15). Реакцию PCR выполняли в условиях, описанных выше в данном разделе. Продукт PCR длиной 449 п.о. гидролизировали AраI и KpnI и выделяли фрагмент длиной 254 п.о., который отделяли электрофорезом и очищали от геля. Плазмиду pSE186а гидролизировали AраI и KpnI, фрагменты ДНК разделяли на агарозном геле и два фрагмента длиной ~3,8 т.п.о. и ~0,4 т.п.о. очищали от геля. Все три фрагмента (фрагменты длиной ~3,8 т.п.о., ~0,4 т.п.о. и 254 п.о.) лигировали друг с другом путем трехстороннего лигирования и лигированную смесь вводили в компетентные клетки DH5 α E. coli. Плазмидную ДНК выделяли из трансформантов, устойчивых к ампициллину, и наличие правильной вставки подтверждали рестрикционным анализом. Данная плаزمида получила название pSE230.

Плазмиду pSE230 гидролизировали EcoRI, клонировали в векторе pWHM3, который предварительно гидролизировали EcoRI, и вводили в клетки DH5 α E. coli. Плазмидную ДНК выделяли из трансформантов, устойчивых к ампициллину, и наличие правильной вставки подтверждали рестрикционным анализом и анализом последовательности ДНК. Указанную плазмидную ДНК вводили в DM1 E. coli, плазмидную ДНК выделяли из трансформантов, устойчивых к ампициллину, и наличие правильной вставки подтверждали рестрикционным анализом. Данную плазмиду, получившую название pSE231, использовали для трансформации протопластов штамма SE180-11 S. avermitilis. Устойчивые к тиострептон трансформанты SE180-11 выделяли, определяли наличие устойчивости к эритромицину и исследовали трансформанты Thio^r Erm^r, анализируя продукты ферментации. Наличие дважды мутированного гена aveC, кодирующего S138T/A139T, позволяло восстановить продуцирование нормальных авермектинов в штамме SE180-11; однако соотношение B2:B1 было равно 0,84:1, показывая, что данная мутация еще больше уменьшает количество продуцируемого авермектина циклогексил B2 по отношению к авермектину циклогексил B1 (таблица 3) по сравнению с уменьшением, достигаемым при трансформации штамма SE180-11 описанными выше плазмидами pSE188 или pSE199.

Другая мутация была создана для дальнейшего уменьшения количества продуцируемого авермектина циклогексил B2 по отношению к авермектину циклогексил B1. Так как мутации S138T/A139T изменяли соотношение B2:B1 в более благоприятном

направлении для авермектина В1, была создана мутация для введения треонина в положение аминокислоты 138 и фенилаланина в положение аминокислоты 139. ДНК-вставку длиной ~1,2 т.п.о., выделенную из плазмиды pSE186, использовали в качестве матрицы для PCR. Затравки для PCR, предназначенные для введения мутаций в

положения нуклеотидов 585 (замена остатка Т остатком А), 588 (замена остатка G остатком Т) и 589 (замена остатка С остатком Т), были предоставлены компанией Genosys Biotechnologies, Inc. (Техас). Нижняя затравка для PCR представляла собой: 5'-GGGGGCGGGCCCGGGTGCAGAGCGGAAATGCCGCTGGCGACGTTTC-3' (SEQ ID No.16), и верхняя затравка для PCR представляла собой: 5'-GGAACATCACGGCATTACACC-3' (SEQ ID No.5). Реакцию PCR выполняли, используя набор для геномной PCR Advantage GC (Clonetech Laboratories, Palo Alto, CA), в буфере, предоставленном изготовителем, в присутствии 200 мкМ dNTP, 200 пмоль каждой затравки, 50 нг матричной ДНК, 1,1 мМ ацетата магния, 1,0 М GC-расплава и 1 единицы ДНК-полимеразы в конечном объеме, равном 50 мкл. Тепловой профиль первого цикла характеризовался температурой 94°C в течение 1 минуты; затем 25 циклов при температуре 94°C в течение 30 секунд и 68°C в течение 2 минут; и 1 цикл при температуре 68°C в течение 3 минут. Продукт PCR длиной 449 п.о. гидролизovali AраI и KpnI и выделяли фрагмент длиной 254 п.о., который отделяли электрофорезом и очищали от геля. Все три фрагмента (фрагменты длиной ~3,8 т.п.о., ~0,4 т.п.о. и 254 п.о.) лигировали друг с другом путем трехстороннего лигирования. Лигированную смесь вводили в компетентные клетки DH5α E. coli. Плазмидную ДНК выделяли из трансформантов, устойчивых к ампициллину, и наличие правильной вставки подтверждали рестрикционным анализом. Данная плазида получила название pSE238.

Плазмиду pSE238 гидролизovali EcoRI, клонировали в векторе pWHM3, который предварительно гидролизovali EcoRI, и вводили в клетки DH5α E. coli. Плазмидную ДНК выделяли из трансформантов, устойчивых к ампициллину, и наличие правильной вставки подтверждали рестрикционным анализом и анализом последовательности ДНК. Указанную плазмидную ДНК вводили в DM1 E. coli, плазмидную ДНК выделяли из трансформантов, устойчивых к ампициллину, и наличие правильной вставки подтверждали рестрикционным анализом. Указанную плазмиду, получившую название pSE239, использовали для трансформации протопластов штамма SE180-11 *S. avermitilis*. Устойчивые к тиострептону трансформанты штамма SR180-11 выделяли, определяли наличие устойчивости к эритромицину и исследовали трансформанты Thio^r Erm^r, анализируя методом ВЭЖХ продукты ферментации. Наличие дважды мутированного гена aveC, кодирующего S138T/A139F позволяло восстановить продуцирование нормальных авермектинов в штамме SE180-11; однако соотношение В2:В1 было равно 0,75:1, показывая, что данная мутация еще больше уменьшает количество продуцируемого авермектина циклогексил В2 по отношению к авермектину циклогексил В1 (таблица 3) по сравнению с уменьшением, достигаемым при трансформации штамма SE180-11 описанными выше плазидами pSE188, pSE199 или pSE231.

Таблица 3				
Штамм <i>S. avermitilis</i> (трансформирующая плазида)	Кол-во испытанных трансформантов	Относительная концентрация В2	Относительная концентрация В1	Среднее соотношение В2:В1
SE180-11 (отсутствие плазмиды)	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

Дополнительные мутации были созданы для дальнейшего уменьшения количества продуцируемого авермектина циклогексил В2 по отношению к авермектину циклогексил В1 методом перестановки ДНК, описанным в публикациях Stemmer, 1994, Nature 370:389-391;

и Stemmer, 1994, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 91:10747-10751, а также в патентах США №№ 5605793, 5811238, 5830721 и 5837458.

Плазмиды с перестановкой ДНК, содержащие мутированные гены *aveC*, вводили в компетентные клетки *dam dcm E. coli*. Плазмидную ДНК выделяли из трансформантов, устойчивых к ампициллину, и использовали для трансформации протопластов штамма SE180-11 *S. avermitilis*. Устойчивые к тиострептону трансформанты штамма SE180-11 выделяли и исследовали на продуцирование авермектинов с соотношением циклогексил B2 : циклогексил B1, равным 1:1 или меньше. Определяли последовательность плазмидной ДНК, выделенной из трансформантов SE180-11, продуцирующих авермектины с соотношением B2:B1, равным 1:1 или меньше.

Было идентифицировано восемь трансформантов, продуцирующих меньшие количества авермектина циклогексил B2 по отношению к авермектину циклогексил B1. Наименьшее соотношение B2:B1, достигаемое в указанных трансформантах, составляло 0,40:1 (таблица 4). Плазмидную ДНК выделяли из всех восьми трансформантов и определяли последовательность ДНК для идентификации мутаций в гене *aveC*. Были обнаружены следующие мутации.

Плазмида pSE290 содержит 4 нуклеотидные мутации, включающие замену остатка Т остатком А в положении нуклеотида 317, замену остатка С остатком А в положении нуклеотида 353, замену остатка G остатком А в положении нуклеотида 438 и замену остатка Т остатком А в положении нуклеотида 1155. Замена нуклеотида в положении 317 вызывает замену остатка D остатком Е в положении аминокислоты 48, и замена нуклеотида в положении 438 вызывает замену остатка А остатком Т в положении аминокислоты 89. Соотношение B2:B1, продуцируемое клетками, несущими данную плазмиду, составило 0,42:1 (таблица 4).

Плазмида pSE291 содержит 4 нуклеотидные мутации, включающие замену остатка G остатком А в положении нуклеотида 272, замену остатка Т остатком А в положении нуклеотида 585, замену остатка G остатком А в положении нуклеотида 588 и замену остатка G остатком А в положении нуклеотида 708. Замена нуклеотида в положении 585 вызывает замену остатка S остатком Т в положении аминокислоты 138, замена нуклеотида в положении 588 вызывает замену остатка А остатком Т в положении аминокислоты 139, и замена нуклеотида в положении 708 вызывает замену остатка G остатком S в положении аминокислоты 179. Соотношение B2:B1 продуцируемое клетками, несущими указанную плазмиду, составило 0,57:1 (таблица 4).

Плазмида pSE292 содержит такие же четыре нуклеотидные мутации, что и плазмида pSE290. Соотношение B2:B1, продуцируемое клетками, несущими указанную плазмиду, составило 0,40:1 (таблица 4).

Плазмида pSE293 содержит 6 нуклеотидных мутаций, включающих замену остатка А остатком G в положении нуклеотида 24, замену остатка А остатком С в положении нуклеотида 286, замену остатка Т остатком С в положении нуклеотида 497, замену остатка С остатком Т в положении нуклеотида 554, замену остатка Т остатком С в положении нуклеотида 580 и замену остатка А остатком Т в положении нуклеотида 886. Замена нуклеотида в положении 286 вызывает замену остатка Q остатком Р в положении аминокислоты 38, замена нуклеотида в положении 580 вызывает замену остатка L остатком Р в положении аминокислоты 136, и замена нуклеотида в положении 886 вызывает замену остатка Е остатком D в положении аминокислоты 238. Соотношение B2:B1, продуцируемое клетками, несущими указанную плазмиду, составило 0,68:1 (таблица 4).

Плазмида pSE294 содержит 6 нуклеотидных мутаций, включающих замену остатка Т остатком С в положении нуклеотида 469, замену остатка Т остатком А в положении нуклеотида 585, замену остатка G остатком А в положении нуклеотида 588, замену остатка G остатком А в положении нуклеотида 708, замену остатка С остатком Т в положении нуклеотида 833 и замену остатка G остатком А в положении нуклеотида 1184. Кроме того, были удалены нуклеотиды в положениях 173, 174 и 175. Замена нуклеотида в положении 469 вызывает замену остатка F остатком S в положении аминокислоты 99,

замена нуклеотида в положении 585 вызывает замену остатка S остатком T в положении аминокислоты 138, замена нуклеотида в положении 588 вызывает замену остатка A остатком T в положении аминокислоты 139, и замена нуклеотида в положении 708 вызывает замену остатка G остатком S в положении аминокислоты 179. Соотношение B2: B1, продуцируемое клетками, несущими указанную плазмиду, составило 0,53:1 (таблица 4).

Плаزمида pSE295 содержит 2 нуклеотидные мутации, включающие замену остатка G остатком A в положении нуклеотида 588 и замену остатка T остатком C в положении нуклеотида 856. Замена нуклеотида в положении 588 вызывает замену остатка A остатком T в положении аминокислоты 139, и замена нуклеотида в положении 856 вызывает замену остатка M остатком T в положении аминокислоты 228. Соотношение B2:B1, продуцируемое клетками, несущими указанную плазмиду, составило 0,80:1 (таблица 4).

Плазмида pSE296 содержит 5 нуклеотидных мутаций, включающих замену остатка T остатком C в положении нуклеотида 155, затему остатка G остатком T в положении нуклеотида 505, замену остатка C остатком T в положении нуклеотида 1039, замену остатка C остатком T в положении нуклеотида 1202 и замену остатка T остатком C в положении нуклеотида 1210. Замена нуклеотида в положении 505 вызывает замену остатка G остатком V в положении аминокислоты 111, и замена нуклеотида в положении 1039 вызывает замену остатка P остатком L в положении аминокислоты 289. Соотношение B2: B1, продуцируемое клетками, несущими указанную плазмиду, составило 0,73:1 (таблица 4).

Плазмида pSE297 содержит 4 нуклеотидные мутации, включающие замену остатка G остатком T в положении нуклеотида 377, замену остатка G остатком A в положении нуклеотида 588, замену остатка A остатком G в положении нуклеотида 633 и замену остатка A остатком T в положении нуклеотида 1067. Замена нуклеотида в положении 588 вызывает замену остатка A остатком T в положении аминокислоты 139, замена нуклеотида в положении 633 вызывает замену остатка K остатком E в положении аминокислоты 154, и замена нуклеотида в положении 1067 вызывает замену остатка Q остатком H в положении аминокислоты 298. Соотношение B2:B1, продуцируемое клетками, несущими указанную плазмиду, составило 0,67:1 (таблица 4).

Таблица 4				
Штамм <i>S. avermitilis</i> (трансформирующая плазмиды)	Кол-во испытанных трансформантов	Относительная концентрация B2	Относительная концентрация B1	Среднее соотношение B2:B1
SE180-11 (отсутствие плазмиды)	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

Описанным ниже способом была выполнена дополнительная серия перестановок ДНК для дальнейшего уменьшения количества продуцируемого авермектина циклогексил B2 по отношению к авермектину циклогексил B1.

Полусинтетическая перестановка

В лучшем клоне была произведена перестановка способом, описанным в публикации международной заявки на патент PCT WO 97/20078 компании Махуген Inc. Отдельные олигонуклеотиды, кодирующие замены, лучше всего соответствующие уменьшению соотношению B2:B1, вводили в реакционную смесь для выполнения реакции перестановки в пятимолярном избытке по отношению к цепям матрицы aveC. Каждое ошибочное спаривание нуклеотидов в олигонуклеотиде было фланкировано 20 полностью идентичными нуклеотидами для обеспечения правильного введения во время реакции перестановки. Олигонуклеотиды были приобретены в компании Operon Technologies (Alameda, CA).

Выращивание HTP *S. avermitilis*

Независимые клоны удаляли с трансформационных планшетов и инокулировали в 200 мкл среды R5 (Kieser, T. et al., "Practical Streptomyces Genetics", 2000, Norwich, U.K., John Innes Foundation) в глубоких 96-луночных планшетах для посева и выращивали, встряхивая, при 30°C. В каждую лунку помещали стеклянный шарик для диспергирования мицелия и перемешивания культуры. В течение указанного времени наблюдался равномерный и плотный рост культур. Через 4-5 дней 20 мкл культуры из среды с посевным материалом переносили на продуцирующие планшеты, к остальному объему добавляли глицерин до конечной концентрации, равной 20%, и замораживали в качестве контрольных планшетов при -80°C. Продуцирующие планшеты инкубировали во влажных условиях при 30°C в течение 12-14 дней. Споруляция штаммов происходила после инкубации в течение 5-8 дней. Продуцирующие планшеты были аналогичны описанным в публикации международной заявки на патент PCT WO 99/41389 компании Pfizer Inc. за исключением того, чтобы добавляли 1% агарозы для создания твердой поверхности.

Экстракция и скрининг методом ESI-MS/MS

В каждую лунку добавляли в общей сложности 1 мл этилацетата и инкубировали, встряхивая, при комнатной температуре в течение 20 минут. Было получено примерно 750 мкл этилацетатной фазы, которую переносили на 96-луночный планшет и упаривали в течение ночи. Осадок вновь суспендировали в 100 мкл метанола и 1 mM NaCl, 5 мкл полученного раствора инъецировали в масс-спектрометр при помощи автоматического пробоотборника в 96-луночном формате и анализировали непосредственно в текучей фазе инъекции без очистки при помощи жидкостной хроматографии или другого метода отделения. Соединения ионизировали методом электрораспылительной ионизации и два отдельных канала контролировали в двух переходах MS/MS. Переход MS/MS для натриевого иона B1 составляет от m/z 921 до m/z 777 и для натриевого иона B2 составляет от m/z 939 до m/z 795 в положительном режиме. Для выполнения данного высокопроизводительного скрининга использовали масс-спектрометр Finnigan TSQ-7000 компании Micromass Quattro-LC и автоматический пробоотборник Twin-Pal компании Leap Technology. Объединение отдельных хроматограмм B1 и B2 для каждой лунки позволило идентифицировать удачные результаты.

Было идентифицировано пятьдесят семь (57) новых комбинаций замен аминокислот, которые позволяют получить соотношения авермектинов циклогексил B2 : циклогексил B1, равные 0,35:1 или меньше (фигура 6). Некоторые из указанных новых мутаций позволяют получить соотношения авермектинов циклогексил B2 : циклогексил B1 около 0,30:1 или меньше; некоторые мутации позволяют получить соотношения авермектинов циклогексил B2 : циклогексил B1 около 0,25:1, и некоторые мутации позволяют получить соотношения авермектинов циклогексил B2 : циклогексил B1 около 0,20:1 или меньше. Были идентифицированы две (2) новые мутации, позволяющие продуцировать авермектины циклогексил B2:циклогексил B1 в соотношениях, равных 0,37 или 0,38.

Депонирование биологических материалов

Указанные ниже плазмиды были депонированы в Американскую коллекцию типовых культур (ATCC) по адресу: 12301 Parklawn Drive, Rockville, MD, 20852, USA, 29 января 1998 г., при этом указанным плазмидам были присвоены следующие номера доступа.

<u>Плазмида</u>	<u>Номер доступа</u>
плазмида pSE180	209605
плазмида pSE186	209604

Американская коллекция типовых культур в настоящее время расположена по адресу: 108101 University Blvd, Manassas, VA. 20110, USA.

Все патенты, заявки на патент и приведенные выше публикации полностью включены в данное описание изобретения.

Объем настоящего изобретения не ограничен конкретными вариантами осуществления, рассмотренными в данном описании изобретения, которые служат только для иллюстрации отдельных объектов данного изобретения, и функционально эквивалентные способы и

компоненты также входят в объем данного изобретения. Из приведенного выше описания изобретения и прилагаемых чертежей специалисту в данной области должны быть очевидны другие модификации изобретения помимо представленных в данном описании изобретения. Такие модификации входят в объем прилагаемой формулы изобретения.

5

СПИСОК ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЕЙ

<110> PFIZER PRODUCTS INC.

10

<120> Ген *Streptomyces avermitilis* и его применение для изменения отношения авермектинов В2:В1

<130> PC23034A

15

<140> PC23034A

<141> 2002-02-12

<160> 16

20

<170> PatentIn Ver. 2.1

<210> 1

<211> 1229

<212> ДНК

25

<213> *Streptomyces avermitilis*

<220>

<221> CDS

<222> (174)..(1085)

30

<400> 1

tcacgaaacc ggacacacca cacacacgaa ggtgagacag cgtgaaccca tccgagccgc 60

tccggcctgcc caacgaacgt gtagtagaca cccgaccgtc cgatgccacg ctctcaccgc 120

35

aggccggcct gaacaggtca ggagcgtgc cccgtgaact gctgtcgttg ccg gtg 176
Val
1

40

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

45

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

50

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	
5	ctc ttc cgg agg tgc cgt gtc gaa cga cgg ctg ctg ttc gac gcc ctt Leu Phe Arg Arg Cys Arg Val Glu Arg Arg Leu Leu Phe Asp Ala Leu	70	75	80	416
10	ctc ttc ctc ggg ctg ctg ttc gcg agc tgg cag agc ccg ctc atg aac Leu Phe Leu Gly Leu Leu Phe Ala Ser Trp Gln Ser Pro Leu Met Asn	85	90	95	464
15	tgg ttc cat tcc gtt ctc gtc tcc aac gcg agt gtg tgg ggc gcg gtg Trp Phe His Ser Val Leu Val Ser Asn Ala Ser Val Trp Gly Ala Val	100	105	110	512
20	ggt tcc tgg ggt ccg tat gtg ccc ggc tgg cag ggg gcg ggc ccg ggt Gly Ser Trp Gly Pro Tyr Val Pro Gly Trp Gln Gly Ala Gly Pro Gly	115	120	125	560
25	gcg gag gcg gaa atg ccg ctg gcg tcg gcc tcc gtc tgc atg tcg gct Ala Glu Ala Glu Met Pro Leu Ala Ser Ala Ser Val Cys Met Ser Ala	130	135	140	608
30	ctg atc gtc acc gtg ctg tgc agc aag gca ctg ggg tgg atc aag gcc Leu Ile Val Thr Val Leu Cys Ser Lys Ala Leu Gly Trp Ile Lys Ala	150	155	160	656
35	cgc cgg ccg gca tgg cgg acc tgg cgg ctg gtc ctg gcc gtg ttc ttc Arg Arg Pro Ala Trp Arg Thr Trp Arg Leu Val Leu Ala Val Phe Phe	165	170	175	704
40	atc ggc atc gtg ctc ggt ctg tcc gag ccg ctg ccg tcc gcc tcc ggg Ile Gly Ile Val Leu Gly Leu Ser Glu Pro Leu Pro Ser Ala Ser Gly	180	185	190	752
45	atc agc gta tgg gcc aga gcg ctg ccc gag gtg acc ttg tgg agt ggc Ile Ser Val Trp Ala Arg Ala Leu Pro Glu Val Thr Leu Trp Ser Gly	195	200	205	800
50	gag tgg tac cag ttc ccc gtg tat cag gcg gtc ggt tcc ggc ctg gtc Glu Trp Tyr Gln Phe Pro Val Tyr Gln Ala Val Gly Ser Gly Leu Val	210	215	220	848
	tgc tgc atg ctg ggc tcg ctg cgc ttc ttc cgc gac gaa cgc gat gag Cys Cys Met Leu Gly Ser Leu Arg Phe Phe Arg Asp Glu Arg Asp Glu	230	235	240	896
	tcg tgg gtg gaa cgg gga gcc tgg cgg ttg ccg caa cgg gca gcg aac Ser Trp Val Glu Arg Gly Ala Trp Arg Leu Pro Gln Arg Ala Ala Asn				944

	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			
5	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	
10				
	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	
15				
	gttcagggca ggtcggagga gacggagaag gggaggcgac cggagttccg gtcacctccc			1145
	ctttgtgcat ggggtggacgg ggatcacgct cccatggcgg cgggctcctc cagacgcacc			1205
	acactcctcg gttcagcgat catg			1229
20				
	<210> 2			
	<211> 303			
	<212> Белок			
25	<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			
30	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			
35	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			
40	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			
	115 120 125			
	Gly Ala Glu Ala Glu Met Pro Leu Ala Ser Ala Ser Val Cys Met Ser			
45	130 135 140			
	Ala Leu Ile Val Thr Val Leu Cys Ser Lys Ala Leu Gly Trp Ile Lys			
	145 150 155 160			
	Ala Arg Arg Pro Ala Trp Arg Thr Trp Arg Leu Val Leu Ala Val Phe			

50

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
 5 195 200 205
 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
 225 230 235 240
 10 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
 15 275 280 285
 Pro Pro Asp Gln Leu Pro Asp Ser Phe Gln Ala Pro Ala Ala Tyr
 290 295 300

 20
 <210> 3
 <211> 1150
 <212> ДНК
 <213> Streptomyces hygroscopicus
 25
 <220>
 <221> CDS
 <222> (58) .. (990)
 30
 <400> 3
 gtcgacgaag accggccgga ggccgtcggc cgggcccata ccgtacgcgg cctgcccg 57

 gtg ttc acc ctt ccc gta aca ctg tgg gcg tgt gtc gcc gcg ctg gtg 105
 Val Phe Thr Leu Pro Val Thr Leu Trp Ala Cys Val Gly Ala Leu Val
 35 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
 40
 tac cgc atc gag aag gcg tcc ccg gcc agg gcc ggt ggg gac tcg gag 201
 Tyr Arg Ile Glu Lys Ala Ser Pro Ala Arg Gly Gly Gly Asp Ser Glu
 35 40 45
 45
 cgg atc gcc gat gtg ctg atc ccg ctg ctg tcc gtg gtg gga gcg gtg 249
 Arg Ile Ala Asp Val Leu Ile Pro Leu Leu Ser Val Val Gly Ala Val
 50 55 60

 50

	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	
5	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	
10	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	
15	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	
20	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	
25	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	
30	ggg 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	
35	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	
40	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	
45	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	
50	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	
	225 230 235 240	
55	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

5 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

10 ttc tgc 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

15 cgt ccg gcg gcc ggc tac tga gaccgccggc accaccacg taccgatgt 1020
 Arg Pro Ala Ala Gly Tyr
 305 310

gcgcgatgtg cctgatgcgc ctgatgtacc cgggggtgtca tcggctcacc tgtggcgcct 1080

20 catgcgggtga gcgctccgcc tcgtccttgt tccggctcct gggctccacg accatacgga 1140

gcggccggggg 1150

<210> 4
 25 <211> 310
 <212> **Белок**
 <213> *Streptomyces hygroscopicus*

<400> 4
 30 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 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
 40 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
 100 105 110
 Val Phe Gly Ala Val Ala Ser Trp Gly Pro Tyr Val Pro Gly Trp Gln
 45 115 120 125
 Gly Ala Gly Ala His Gln Glu Ala Glu Leu Pro Leu Ala Thr Leu Ser
 130 135 140
 Ile Cys Met Thr Ala Met Met Ala Ala Val Ala Cys Gly Lys Gly Met

50

145 150 155 160
 Gly Leu Ala Ala Ala Arg Trp Pro Arg Leu Gly Pro Leu Arg Leu Ile
 165 170 175
 5 Ala Leu Gly Phe Leu Leu Val Val Leu Leu Asp Ile Ala Glu Pro Leu
 180 185 190
 Val Ser Phe Ala Gly Val Ser Val Trp Thr Arg Ala Val Pro Glu Leu
 195 200 205
 Thr Ile Trp Ser Gly His Trp Tyr Gln Phe Pro Leu Tyr Gln Met Val
 210 215 220
 10 Ala Ser Ala Leu Phe Gly Ala Ser Leu Gly Ala Ala Arg His Phe Arg
 225 230 235 240
 Asn Arg Arg Gly Glu Thr Cys Leu Glu Ser Gly Ala Ala Leu Leu Pro
 245 250 255
 15 Glu Gly Pro Arg Pro Trp Val Arg Leu Leu Ala Val Val Gly Gly Ala
 260 265 270
 Asn Ile Ser Ile Ala Leu Tyr Thr Gly Ala His Gly Ala His Ile Leu
 275 280 285
 Phe Ser Leu Met Asp Gly Ala Pro Pro Asp Arg Leu Pro Glu Phe Phe
 290 295 300
 20 Arg Pro Ala Ala Gly Tyr
 305 310

 25 <210> 5
 <211> 215
 <212> **Белок**
 <213> *Streptomyces griseochromogenes*

 30 <400> 5
 Val Ile Gly Trp Ala Ala Leu Gly Ala Val Phe Leu Val Leu Gln Val
 1 5 10 15

 35 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

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

 Trp Leu Val Arg Arg Trp Arg Ala Glu Arg Arg Leu Ser Phe Asp Ala
 65 70 75 80
 45 Leu Leu Phe Thr Gly Val Leu Phe Ala Gly Trp Leu Ser Pro Leu Met
 85 90 95

 50

	Asn Trp Phe His Pro Val Leu Met Ala Asn Thr His Val Trp Gly Ala	
	100 105 110	
5	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	
10	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	
15	Leu Thr Ala Val Ala Phe Asp Leu Ser Glu Pro Phe Ile Ser Phe Ala	
	180 185 190	
20	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	
25		
	<210> 6	
	<211> 18	
	<212> ДНК	
30	<213> Streptomyces avermitilis	
	<400> 6	
	tcacgaaaacc ggacacac	18
35		
	<210> 7	
	<211> 18	
	<212> ДНК	
	<213> Streptomyces avermitilis	
40		
	<400> 7	
	catgatcgct gaaccgag	18
45		
	<210> 8	
	<211> 20	
	<212> ДНК	
	<213> Streptomyces avermitilis	
50		

	<400> 8	
	ggttccggat gccgttctcg	20
5	<210> 9	
	<211> 21	
	<212> ДНК	
	<213> Streptomyces avermitilis	
10	<400> 9	
	aactccggtc gactcccctt c	21
	<210> 10	
15	<211> 19	
	<212> ДНК	
	<213> Streptomyces avermitilis	
	<400> 10	
20	gcaaggatac ggggactac	19
	<210> 11	
	<211> 18	
25	<212> ДНК	
	<213> Streptomyces avermitilis	
	<400> 11	
30	gaaccgaccg ccgatac	18
	<210> 12	
	<211> 43	
	<212> ДНК	
35	<213> Streptomyces avermitilis	
	<400> 12	
	gggggcgggc ccgggtgagg aggcggaaat gccctggcg acg	43
40	<210> 13	
	<211> 20	
	<212> ДНК	
	<213> Streptomyces avermitilis	
45	<400> 13	
	ggaaccgacc gcctgataca	20
50		

<210> 14
 <211> 46
 <212> ДНК
 <213> *Streptomyces avermitilis*

5

<400> 14
 gggggcgggc ccgggtgcgg aggcggaaat gccgctggcg acgacc 46

10

<210> 15
 <211> 20
 <212> ДНК
 <213> *Streptomyces avermitilis*

15

<400> 15
 ggaacatcac ggcattcacc 20

20

<210> 16
 <211> 46
 <212> ДНК
 <213> *Streptomyces avermitilis*

25

<400> 16
 gggggcgggc ccgggtgcgg aggcggaaat gccgctggcg acgttc 46

Формула изобретения

1. Молекула полинуклеотида, содержащая нуклеотидную последовательность, которая, по существу, аналогична последовательности аллеля *aveC* *Streptomyces avermitilis*,
 30 последовательности плазмиды pSE186 (ATCC 209604), кодирующей продукт гена *AveC* *S. avermitilis*, нуклеотидной последовательности открытой рамки считывания (ORF) *aveC* *S. avermitilis*, показанной в SEQ ID No.1, или их вырожденному варианту, но при этом нуклеотидная последовательность дополнительно содержит мутации, кодирующие комбинацию замен аминокислот в положении аминокислотных остатков, соответствующих
 35 положениям аминокислот SEQ ID No.2, благодаря чему клетки штамма *S.avermitilis* ATCC 53692, в которых инактивирован аллель *aveC* дикого типа и которые экспрессируют молекулу полинуклеотида, содержащую мутированную нуклеотидную последовательность, способны продуцировать авермектины класса 2:1 с меньшим соотношением по сравнению с соотношением, продуцируемым клетками штамма *S.avermitilis* ATCC 53692,
 40 экспрессирующими только аллель *aveC* дикого типа, причем, когда авермектины класса 2:1 являются авермектинами циклогексил В2: циклогексил В1, соотношение авермектинов класса 2:1 составляет 0,35:1 или меньше, где комбинация замен аминокислот выбрана из группы, состоящей из

45

(a) D48E, A61T, A89T, S138T, A139T, G179S, A198G, P289L;

(b) G40S, D48E, L136P, G179S, E238D;

(c) D48E, L136P, R163Q, G179S;

(d) D48E, L136P, R163Q, G179S, E238D;

(e) D48E, L136P, R163Q, G179S, A200G, E238D;

(f) D48E, L136P, G179S, E238D;

50

(g) D48E, A61T, L136P, G179S, E238D;

(h) D48E, A61T, L136P, G179S;

(i) D48E, A89T, S138T, A139T, G179S;

(j) D48E, A61T, L136P, G179S, A198G, P202S, E238D,

- P289L;
 (k) D48E, A61T, L136P, S138T, A139F, G179S, E238D, P289L;
 (l) D48E, L136P, G179S, A198C, E238D, P289L;
 5 (m) D48E, A61T, S138T, A139F, G179S, A198G, P289L;
 (n) D48E, L84P, G111V, S138T, A139T, G179S, A198G, P289L;
 (o) Y28C, D48E, A61T, A89T, S138T, A139T, G179S, E238D;
 (p) D48E, A61T, A107T, S108G, L136P, G179S, S192A, E238D, P289L;
 10 (q) D48E, L136P, G179S, R250W;
 (r) D48E, A89T, S138T, A139T, R163Q, G179S;
 (s) D48E, L136P, G179S, A198G, P289L;
 (t) D48E, F78L, A89T, L136P, G179S;
 15 (u) D48E, A89T, S138T, A139T, G179S, E238D, F278L;
 (v) D48E, A89T, L136P, R163Q, G179S;
 (w) D48E, A61T, A89T, C111V, S138T, A139F, G179S, E238D, P289L;
 (x) D25G, D48E, A89T, L136P, S138T, A139T, V141A, I159T, R163Q, G179S;
 20 (y) D48E, A89T, S90G, L136P, R163Q, G179S, E238D;
 (z) D48E, A61T, A89T, Gil IV, S138T, A139T, G179S, E238D, P289L;
 (aa) D48E, A89T, S138T, A139T, G179S;
 25 (ab) D48E, L136P, R163Q, G179S, S231L;
 (ac) D48E, L136P, S138T, A139F, G179S, V196A, E238D;
 (ad) D48E, A61T, A89T, F99S, S138T, A139T, G179S, E238D;
 (ae) G35S, D48E, A89T, S138T, A139T, G179S, P289L;
 (af) D48E, A61T, A89T, S138T, A139T, G179S, V196A, E238D;
 30 (ag) D48E, A89T, G111V, S138T, A139T, G179S, A198G, E238D;
 (ah) S41G, D48E, A89T, L136P, G179S;
 (ai) D48E, A89T, L136P, R163Q, G179S, P252S;
 (aj) D48E, A89T, L136P, G179S, F234S;
 (ak) D48E, A89T, L138P, R163Q, G179S, E238D;
 35 (al) Q36R, D48E, A89T, L136P, G179S, E238D;
 (am) D48E, A89T, L136P, R163Q, G179S;
 (an) D48E, A89T, S138T, G179S;
 (ao) D48E, A89T, L136P, G179S, E238D;
 (ap) D48E, A89T, L136P, K154E, G179S, E238D;
 40 (aq) D48E, A89T, S138T, A139T, K154R, G179S, V196A, P289L;
 (ar) D48E, A89T, S138T, A139F, G179S, V196A, E238D;
 (as) D48E, A61T, A89T, L136P, G179S, V196A, A198G, P289L;
 (at) D48E, A61T, S138T, A139F, G179S, G196A, E238D, P289L;
 (au) D48E, A89T, L136P, G179S;
 45 (av) D48E, A89T, V120A, L136P, G179S;
 (aw) D48E, A61T, A89T, S138T, A139F, G179S, V196A, A198G, E238D;
 (ax) D48E, A61T, A89T, G111V, S138T, A139F, G179S, V196A, E238D;
 50 (ay) D48E, A61T, A89T, S138T, A139T, G179S, V196A, E238D, P289L;
 (az) D48E, A61T, A89T, L136P, S138T, A139F, G179S, A198G, E238D;

- (ba) D48E, A89T, S138T, A139F, G179S, A198G, V220A;
 (bb) D48E, A61T, A89T, S138T, A139T, G179S, V196A, E238D, R239H, P289L;
 (be) D48E, A61T, A89T, L136P, G179S, P289L;
- 5 (bd) D48E, A89T, S138T, A139T, G179S, V196A, E238D, P289L;
 (be) D48E, A61T, A89T, S138T, A139F, G179S, V196A, E238D;
 (da) S41G, D48E, A61T, R71L, A89T, L136M, S138T, A139T, T149S, G179S, V196A, E238D, F278L, P289L;
 (db) S41G, D48E, A61T, R71L, A89T, L136M, S138T, A139T, T149S,
- 10 F176C, G179S, V196A, E238D, P289L;
 (dc) D48E, R71L, A89T, L136P, T149S, F176C, G179S, E238D, I280V;
 (dd) D48E, A61T, R71L, W110L, T149S, G179S, V196A, L206M, E238D, V271A, I280V;
- 15 (de) D48E, A61T, R71L, A89T, L136M, S138T, A139T, T149S, G179S, V196A, E238D, H279Q, P289L;
 (df) D48E, A61T, R71L, A89T, L136M, S138T, A139T, T149S, G179S, V196A, E238D, G287E, P289Q;
 (dg) D48E, A61T, R71L, A89T, L136M, S138T, A139T, T149S
- 20 G179S, V196A, E238D, P289L;
 (dh) D48E, A61T, R71L, A89T, A139T, T149S, F176C, G179S, V196A, E238D, V285G, P289L;
 (di) Q38R, D48E, A61T, R71L, L87V, A89T, L136M, S138T, A139T, T149S, G179S, V196A, E238D, P289L;
- 25 (dj) D48E, A61T, L87V, A89T, W110L, S138T, A139T, T149S, G179S, V196A, E238D, P289L;
 (dk) D48E, A61T, R71L, A89T, L136M, S138T, A139T, T149S, G179S, V196A, E238D, P289L;
 (dl) D48E, A89T, L136P, K154E, G179S, S231L, E238D;
- 30 (ea) D48E, A61T, R71 L, A89T, L136P, T149S, F176C, G179S, V196A, E238D, I280V;
 (eb) D48E, R71L, A89T, L136P, T149S, F176C, G179S, E238D, I280V;
 (ec) Q36P, D48E, A61T, R71L, A89T, L136P, T149S, F176C, G179S,
- 35 V196A, E238D, I280V;
 (ed) D48E, A61T, R71L, A89T, A139T, T149S, F176C, G179S, V196A, E238D, I280V;
 (ee) V2M, D48E, A61T, R71L, A89T, L136P, T149S, F176C, G179S, V196A, E238D, I280V;
- 40 (ef) D48E, A61T, R71L, A89T, L136P, T149S, F176C, G179S, V196A, E238D, I280V, A302T;
 (eg) D48E, R71L, A89T, L136P, T149S, F176C, G179S, E238D, P289L;
 (eh) D48E, R71L, A89T, L136P, T149S, F176C, G179S, E238D,
- 45 A302T;
 (ei) D48E, R71L, A89T, L136P, T149S, F176C, G179S, V196A, E238D, I280V;
 (ej) D48E, A61T, R71L, A89T, L136P, T149S, F176C, G179S, V196A, E238D;
- 50 (ek) V2M, D48E, R71L, A89T, L136P, T149S, F176C, G179S, V196A, E238D, I280V;
 (el) D48E, A61T, R71L, A89T, L136P, T149S, R162H, F176C, G179S, V196A, E238D, I280V;

(em) D48E, R71L, A89T, V120A, L136P, T149S, K154E, G179S, S231L, E238D;

(en) D48E, R71L, A89T, V120A, L136P, T149S, F176C, G179S, S231L, E238D, I280V;

5 (eo) D48E, A61T, R71L, L87V, A89T, A139T, T149S, F176C, G179S, V196A, E238D, V285G, P289L;

(ep) D48E, A61T, R71L, L87V, A89T, S90N, A139T, T149S, F176C, G179S, V196A, E238D, V285G, P289L;

(eq) D48E, R71L, A89T, L136P, K154E, G179S, S231L, E238D;

10 (er) D48E, R71L, A89T, V120A, L136P, K154E, F176C, G179S, S231L, E238D;

(es) D48E, R71L, A89T, V120A, L136P, T149S, K154E, F176C, G179S, S231L, E238D.

2. Молекула полинуклеотида по п.1, где комбинация замен аминокислот содержит комбинацию группы (ea): D48E, A61T, R71L, A89T, L136P, T149S, F176C, G179S, V196A, E238D, I280V.

3. Молекула полинуклеотида по любому из пп.1 и 2, где соотношение авермектинов циклогексил B2:циклогексил B1 составляет примерно 0,20:1 или меньше.

4. Молекула полинуклеотида по любому из пп.1 и 2, где соотношение авермектинов циклогексил B2:циклогексил B1 составляет примерно 0,10:1 или меньше.

5. Рекombинантный вектор, предназначенный для продуцирования авермектинов класса 2:1 в уменьшенном соотношении, содержащий молекулу полинуклеотида по любому из пп.1-4.

6. Клетка-хозяин, предназначенная для продуцирования авермектинов класса 2:1 в уменьшенном соотношении, содержащая рекombинантный вектор по п.5.

7. Клетка-хозяин по п.6, которая является клеткой рода *Streptomyces*.

8. Клетка-хозяин по п.7, которая является клеткой *Streptomyces avermitilis*.

9. Способ получения мутированного штамма *Streptomyces avermitilis*, включающий (i) мутирование аллеля *aveC* в клетке штамма *S. avermitilis*, вызывающее комбинацию замен аминокислот в продукте гена *AveC*, или (ii) введение в клетку штамма *S. avermitilis* мутированного аллеля *aveC* или его вырожденного варианта, кодирующего продукт гена *AveC*, содержащий комбинацию замен аминокислот, где клетки, содержащие мутированный аллель *aveC* или его вырожденный вариант, кодирующий продукт гена *AveC*, способны продуцировать авермектины циклогексил B2:циклогексил B1 в соотношении 0,35:1 или меньше, при этом комбинация замен аминокислот выбрана из группы, приведенной в п.1.

10. Способ по п.9, в котором комбинация замен аминокислот содержит комбинацию группы (ea): D48E, A61T, R71L, A89T, L136P, T149S, F176C, G179S, V196A, E238D, I280V.

11. Способ по п.10, в котором соотношение авермектинов циклогексил B2: циклогексил B1 составляет примерно 0,20:1 или меньше.

40 12. Способ по п.10, в котором соотношение авермектинов циклогексил B2: циклогексил B1 составляет примерно 0,10:1 или меньше.

13. Клетка рода *Streptomyces*, предназначенная для продуцирования авермектинов класса 2:1 в уменьшенном соотношении, которая содержит мутированный аллель *aveC* *S. avermitilis* или его вырожденный вариант, кодирующий продукт гена *AveC*, включающий комбинацию замен аминокислот, выбранную из группы, приведенной в п.1.

14. Клетка по п.13, в которой комбинация замен аминокислот содержит комбинацию группы (ea): D48E, A61T, R71L, A89T, L136P, T149S, F176C, G179S, V196A, E238D, I280V.

15. Клетка по любому из пп.13 и 14, которая является клеткой *Streptomyces avermitilis*.

50 16. Способ получения авермектинов класса 2:1 в уменьшенном соотношении, включающий культивирование штамма клеток *Streptomyces avermitilis* по п.15 в культуральной среде в условиях, позволяющих или индуцирующих продуцирование им авермектинов, и выделение указанных авермектинов из культуры.

17. Композиция авермектинов циклогексил B2:циклогексил B1, обладающая

противопаразитарными и пестицидными свойствами, представляющая собой культуральную среду после культивирования клеток *Streptomyces avermitilis*, полученных по любому из пп.9-12, содержащую авермектины циклогексил В2: циклогексил В1 в соотношении 0,35:1 или меньше.

5

10

15

20

25

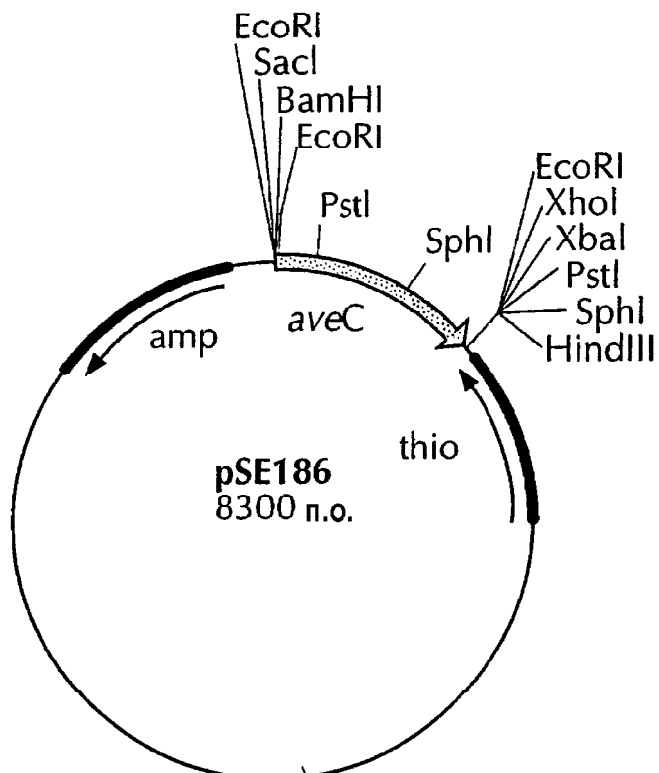
30

35

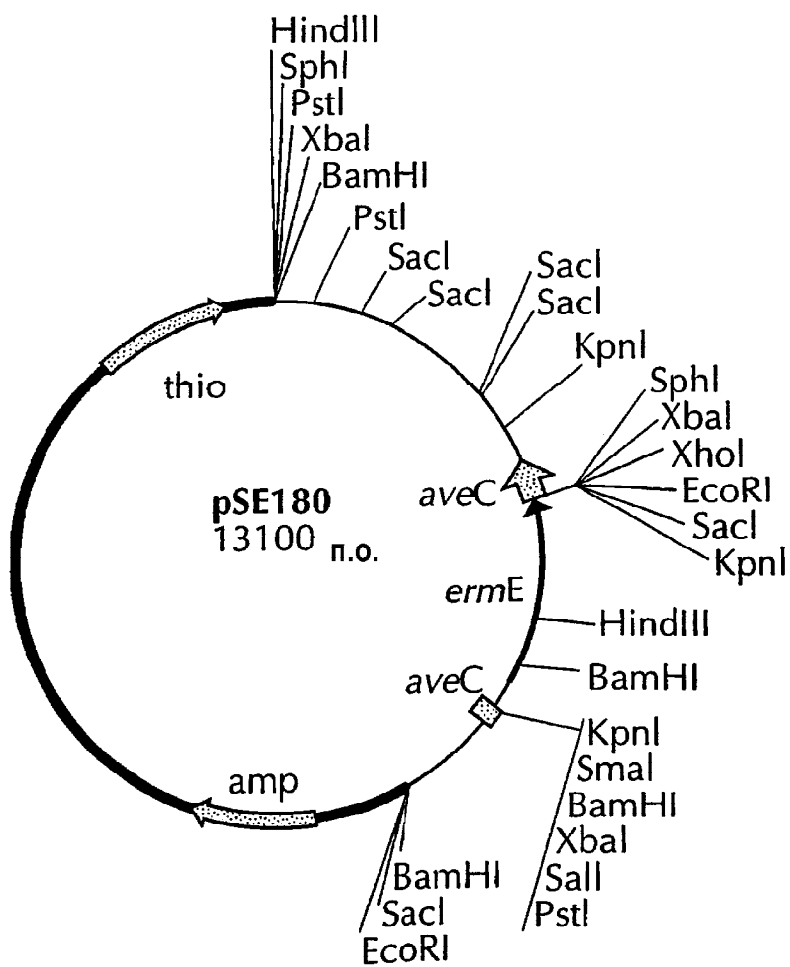
40

45

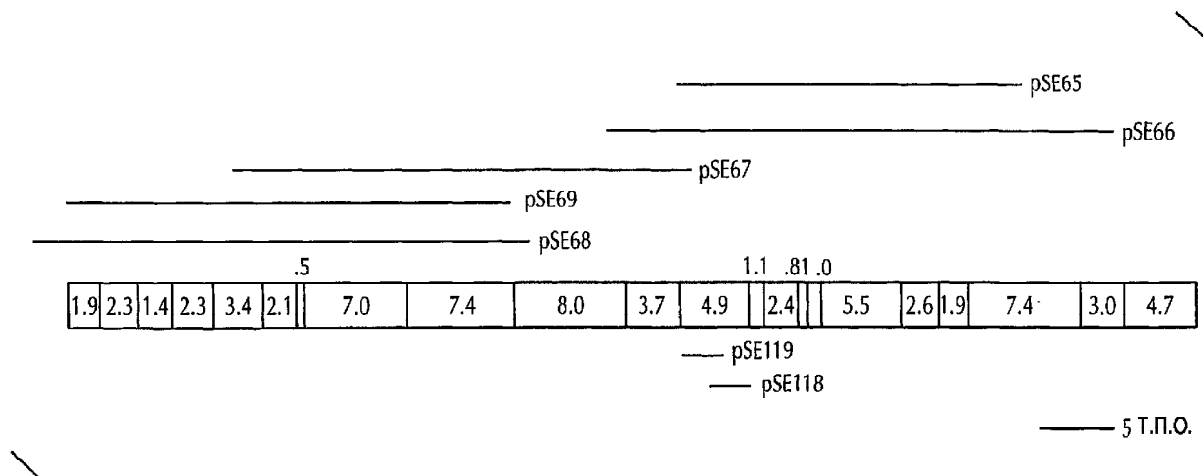
50



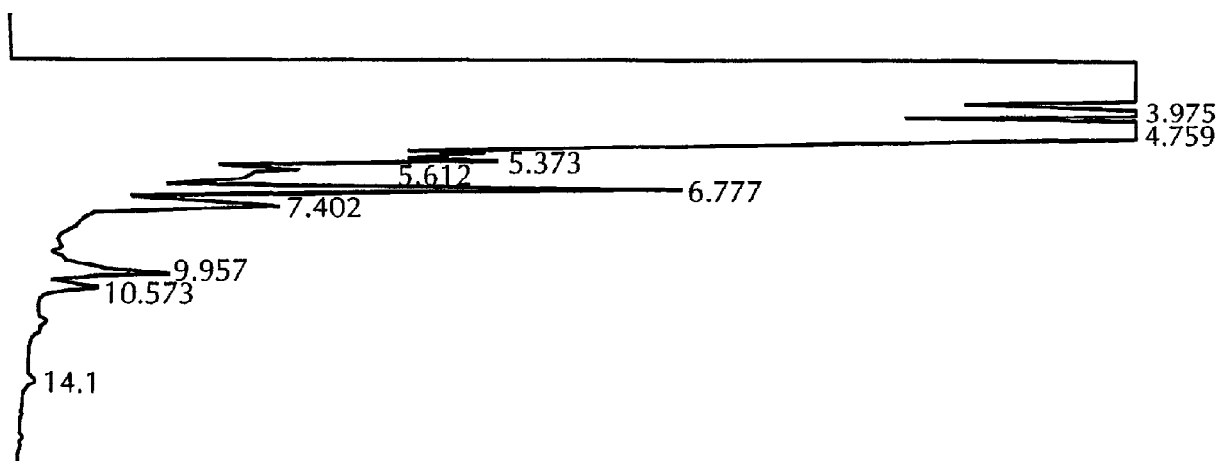
ФИГ.2



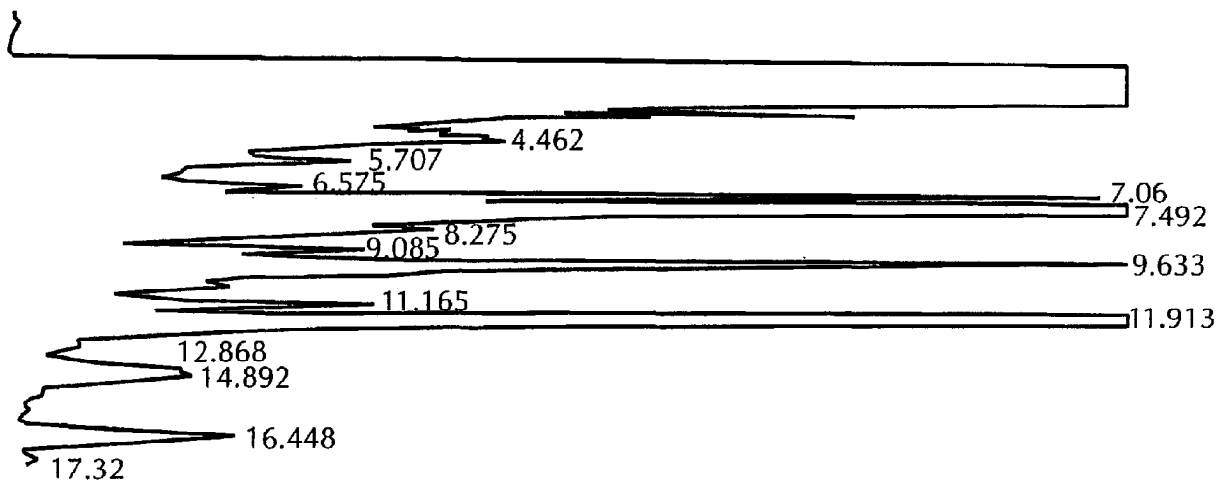
ФИГ.3



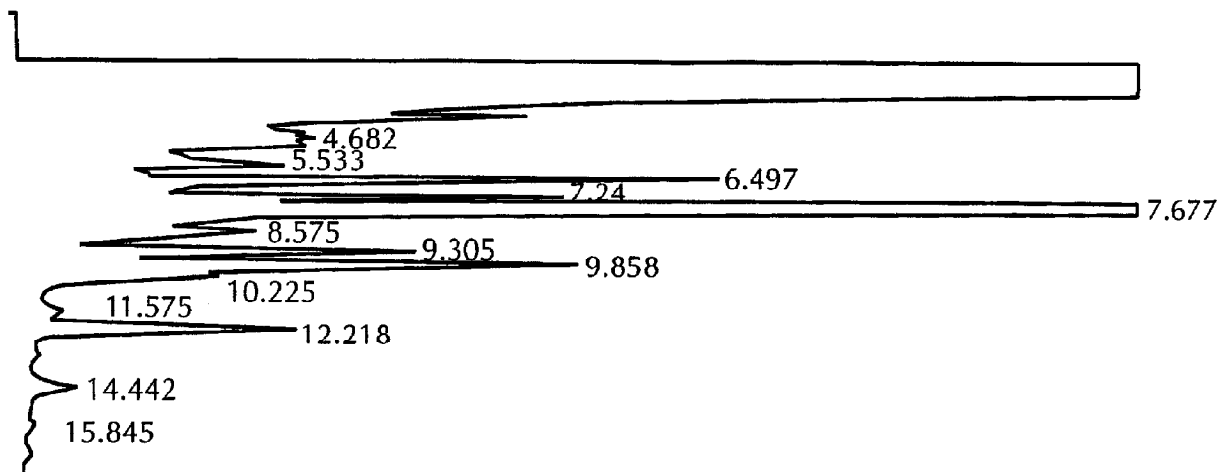
ФИГ.4



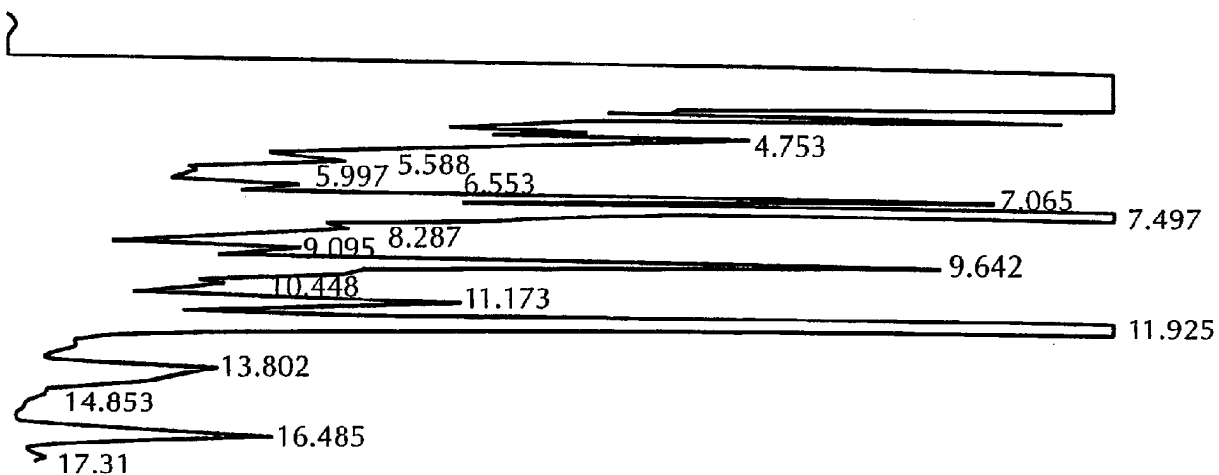
ФИГ.5А



ФИГ.5В



ФИГ.5С



ФИГ.5D

ПЛАЗМИДА	МУТАЦИИ	[B2]	[B1]	B2/B1
pSE501	D48E, L136P, G179S, E238D	52	184	0.28
	(A132G), T317A, T580C, G708A, A887T, (A1124G)			
PSE502	D48E, A89T, L136P, G179S, E238D	42	204	0.2
	T317A, G438A, T580C, G708A, A887T			
pSE503	D48E, A89T, L136P, K154E, G179S, E238D	32	172	0.19
	T317A, G438A, (T497C), T580C, T633C, G708A, (C775T), A887T			
PSE504	D25G, D48E, A89T, L136P, S138T, A139T, V141A, I159T, R163Q, G179S	44	205	0.21
	A247G, T317A, G438A, (T497C), T580C, T585A, G588A, T595C, T649C, G661A, G708A, (C884T)			
pSE505	D48E, A89T, S138T, A139T, K154R, G179S, V196A, P289L	35	178	0.2
	T317A, G438A, T585A, G588A, A634G, G708A, T760C, A761C, C1039T			
pSE506	D48E, A89T, S138T, A139F, G179S, V196A, E238D	26	135	0.19
	T317A, G438A, (T497C), T585A, G588T, G589T, G708A, T760C, A761C, A887C			
pSE507	D48E, A61T, A89T, L136P, G179S, V196A, A198G, P289L	18	88	0.2
	T317A, G354A, G438A, (T497C), T580C, G708A, T760C, A761C, C766G, C1039T			

ФИГ.6А

Плазмида	МУТАЦИИ	[B2]	[B1]	B2/B1]
pSE508	D48E, A89T, S90C, L136P, R163Q, G179S, E238D	22	91	0.24
	T317A, G438A, A441 C, T580C, G661A, G708A, A887T, (A938G)			
pSE509	D48E, A61T, S138T, A139F, G179S, G196A, E238D, P289L	22	114	0.19
	(G136A), T317A, G354A, (T497C), T585A, G588T, C589T, G708A, T760C, A761C, A887C, C1039T			
pSE510	D48E, A61T, L136P, G179S, E238D	64	211	0.30
	T317A, G354A, (T497C), T580C, G708A, A887C			
pSE511	D48E, A61T, A89T, G111V, S138T, A139T, G179S, E238D, P289L	20	91	0.21
	T317A, G354A, (T416C), G438A, G505T, T585A, G588A, G708A, (G775T), A887C, C1039T			
pSE512	D48E, A61T, L136P, G179S	55	88	0.29
	T317A, G354A, (T497C), T580C, G708A			
pSE514	D48E, A89T, L136P, G179S	36	175	0.20
	(T33A), T317A, G438A, (T497C), T580C, G708A			
pSE515	D48E, A89T, V120A, L136P, G179S	36	189	0.19
	T317A, G438A, T532C, T580C, G708A, (T1031C)			

ФИГ.6В

Плазмида	МУТАЦИИ	[B2]	[B1]	B2/B1
pSE517	D48E, A61T, A89T, S138T, A139F, G179S, V196A, A198G, E238D	20	99	0.20
	T317A, G354A, G438A, (T497C), T585A, G588T, C589T, G708A, T760C, A761C, C766G, A887C			
PSE518	D48E, A61T, A89T, G111V, S138T, A139F, G179S, V196A, E238D	11	57	0.18
	T317A, G354A, G438A, G505T, T585A, G588T, C589T, G708A, T760C, A761C, A887C			
pSE519	D48E, A89T, S138T, A139T, G179S	40	153	0.26
	T317A, G438A, T585A, G588A, G708A			
pSE520	D48E, A89T, S138T, A139T, G179S	45	177	0.25
	T317A, G438A, (T497C), T585C, G588A, G708A			
pSE523	D48E, L136P, R163Q, G179S, S231L	37	168	0.22
	T317A, T580C, G661A, G708A, (T797C), C865T			
pSE524	D48E, A89T, L136P, G179S, E238D	25	137	0.18
	T317A, G438A, (T497C), T580C, G708A, A887T			
PSE525	D48E, A89T, L136P, G179S	22	129	0.17
	T317A, G438A, (T497C), T580C, G708A			

ФИГ.6С

Плазмида	МУТАЦИИ	[B2]	[B1]	[B2/B1]
pSE526	D48E, A61T, L136P, G179S, A198G, P202S, E238D, P289L,	35	135	0.26
	T317A, G354A, (T497C), T580C, G708A, C766G, C777T, A887C, C1039T			
pSE527	D48E, L136P, S138T, A139F, G179S, V196A, E238D	31	119	0.25
	T317A, (T497C), T580C, T585A, G588T, C589T, G708A, T760C, A761C, A887C			
pSE528	D48E, A61T, L136P, S138T, A139F, G179S, E238D, P289L	50	160	0.30
	T317A, G354A, (T497C), T580C, T585A, G588T, C589T, G708A, A887C, C1039T			
pSE529	D48E, A61T, A89T, S138T, A139T, G179S, V196A, E238D, P289L	26	150	0.17
	T317A, G354A, G438A, (T497C), T585A, G588A, G708A, T760C, A761C, A887C, C1039T			
pSE530	D48E, L136P, G179S, A198G, E238D, P289L	37	136	0.27
	(C97T), T317A, T580C, G708A, C766G, A887C, C1039T			
pSE531	D48E, A61T, S138T, A139F, G179S, A198G, P289L	27	101	0.27
	T317A, G354A, (T497C), T585A, G588T, C589T, G708A, C766G, C1039T			

ФИГ.6D

Плазмида	МУТАЦИИ	[B2]	[B1]	B2/B1
pSE532	D48E, A61T, A89T, L136P, S138T, A139F, G179S, A198G, E238D	19	91	0.20
	T317A, G354A, G438A, (T497C), T580C, T585A, G588T, C589T, G708A, C766G, A887C			
pSE534	D48E, L84P, G111V, S138T A139T, G179S, A198G, P289L	37	139	0.26
	T317A, T424C, G505T, T585A, G588A, G708A, C766G, C1039T			
pSE535	Y28C, D48E, A61T, A89T, S138T, A139T, G179S, E238D	34	132	0.26
	A256G, T317A, G354A, G438A, T585A, G588A, G708A, A887C			
pSE536	D48E, A89T, S138T, A139F, G179S, A198G, V220A	19	106	0.17
	(G137T), T317A, G438A, (T497C), T585A, G588T, C589T, G708A, C766G, T832C			
pSE537	D48E, A61T, A89T, S138T, A139T, G179S, V196A, E238D, R239H, P289L	34	171	0.19
	T317A, G354A, G438A, (T497C), T585A, G588A, G708A, T760C, A761C, A887C, G889A, C1039T			
pSE538	D48E, A61T, A89T, S138T A139T, G179S, A198G, P289L	13	39	0.33
	T317A, G354A, G438A, T585A, G588A, G708A, C766G, C1039T			
pSE539	D48E, A61T, A89T, F99S, S138T, A139T, G179S, E238D	43	179	0.24
	T317A, G354A, G438A, G469C, (T497C), T585A, G588A, G708A, A887C, (C1094T)			

ФИГ.6Е

Плазмида	МУТАЦИИ	[B2]	[B1]	B2/B1
pSE540	G35S, D48E, A89T, S138T, A139T, G179S, P289L	42	180	0.23
	G276A, T317A, G438A, (T497C), T585A, G588A, G708A, C1039T			
pSE541	D48E, A61T, A89T, L136P, G179S, P289L	36	174	0.20
	(C266T), T317A, G354A, G438A, (T497C), T580C, G708A, C1039T			
pSE542	D48E, A61T, A107T, S108G, L136P, G179S, S192A, E238D, P289L	50	175	0.29
	T317A, G354A, G492A, A495G, (T497C), T580C, G708A, T747G, A887C, C1039T			
pSE543	D48E, A61T, A89T, G111V, S138T, A139F, G179S, E238D, P289L	17	67	0.25
	T317A, G354A, G438A, G505T, T585A, G588T, C589T, G708A, A887C, C1039T			
pSE545	D48E, L136P, G179S, R250W	37	134	0.27
	G317A, T580C, G708A, C921T			
pSE546	D48E, L136P, G179S, E238D	48	178	0.27
	G317A, T580C, G708A, A887T			
pSE547	D48E, A61T, A89T, S138T, A139T, G179S, V196A, E238D	32	142	0.23
	T317A, G354A, G438A, T585A, G588A, G708A, T760C, A761C, A887C			

ФИГ.6F

Плазмида	МУТАЦИИ	[B2]	[B1]	B2/B1
pSE548	D48E, A89T, S138T, A139T, R163Q, G179S	41	157	0.26
	(T114C), (T130C), T317A G438A, T585A, G588A, G661A, G708A			
pSE549	D48E, A89T, S138T, A139T G179S, V196A, E238D, P289L	24	141	0.17
	G317A, G438A, (T497C), T585A, G588A, G708A, T760C, A761C, A887C, C1039T			
pSE550	D48E, A89T, G111V, S138T, A139T, G179S, A198G, E238D	19	76	0.25
	T317A, G438A, G505T, T585A, G588A, G708A, C766G, A887C			
pSE551	D48E, A61T, A89T, S138T, A139F, G179S, V196A, E238D	24	141	0.17
	T317A, G354A, G438A, (T497C), T585A, G588T, C589T, G708A, T760C, A761C, A887C			
pSE552	D48E, L136P, G179S, A198G, P289L	40	154	0.26
	T317A, (T497C), T580C, G708A, C766G, C1039T			
pSE553	D48E, A89T, S138T, A139T, G179S, V196A, E238D, P289L	23	123	0.18
	T317A, G438A, (T497C), T585A, G588A, G708A, T760C, A761C, A887C, C1039T			
pSE554	D48E, A61T, A89T, S138T, A139T, G179S, V196A, E238D, P289L	30	162	0.18
	T317A, G354A, G438A, (T497C), T585A, G588A, G708A, T760C, A761C, A887C, C1039T			

ФИГ.6G

ПЛАЗМИДА	МУТАЦИИ	[B2]	[B1]	B2/B1
pSE556	D48E, S138T, A139T, G179S, E238D	66	177	0.37
	(T169C), T317A, T585A, G588A, G708A, A887T			
pSE557	D48E, F78L, A89T, L136P, G179S	57	219	0.26
	A317A, T405C, G438A, T580C, G708A			
pSE558	S41G, D48E, A89T, L136P, G179S	51	215	0.24
	(G87A), A294G, T317A, G438A, T580C, G708A			
pSE559	G40S, D48E, L136P, G179S, E238D	81	247	0.33
	G291A, T317A, T580C, G708A, A887T			
pSE561	Y28C, Q38R, D48E, L136P, G179S, E238D	31	83	0.37
	A256G, A286G, T317A, (T497C), T580C, G708A, A887T			
pSE563	D48E, A89T, L136P, R163Q, G179S, P252S	43	177	0.24
	T317A, G438A, T580C, G661A, G708A, C927T			
pSE564	D48E, A89T, S138T, A139T, G179S, E238D, F278L	61	216	0.28
	T317A, G438A, (T497C), T585A, G588A, G708A, A887T, T1005C			
pSE565	D48E, A89T, S138T, A139T, G179S, E238D, F278L	59	210	0.28
	T317A, G438A, (T497C), T585A, G588A, G708A, A887T, T1005C			

ФИГ.6Н

ПЛАЗМИДА	МУТАЦИИ	[B2]	[B1]	B2/B1
pSE566	D48E, A89T, L136P, G179S, F234S	37	154	0.24
	T317A, (C341T), G438A, (T497C), T580C, (C695T), G708A, T874C			
pSE567	D48E, L136P, R163Q, G179S,	60	192	0.31
	T317A, T580C, G661A, G708A			
pSE568	D48E, A89T, L136P, R163Q, G179S	48	173	0.28
	(T85C), T317A, G438A, (T497C), T580C, G661A, G708A, (C800T)			
pSE569	D48E, S138T, A139T, G179S, E238D	59	153	0.38
	(T104C), T317A, (T497C), T585A, G588A, G708A, A887T			
pSE570	D48E, L136P, R163Q, G179S, E238D	73	221	0.33
	T317A, T580C, G661A, G708A, A887T			
pSE571	D48E, L136P, R163Q, G179S, A200G, E238D	75	236	0.32
	(T67C), T317A, T580C, G661A, G708A, C772G, A887T			
pSE572	D48E, L136P, R163Q, G179S, E238D	74	229	0.32
	T317A, (T497C), T580C, G661A, G708A, A887T			
pSE573	D48E, A89T, L136P, R163Q, G179S, E238D	39	173	0.23
	T317A, G438A, T580C, G661A, G708A, A887T			

ФИГ.6I

Плазмида	МУТАЦИИ	[B2]	[B1]	B2/B1
pSE574	Q36R, D48E, A89T, L136P, G179S, E238D	53	231	0.23
	A280G, T317A, (G359A), G438A, T580C, G708A, (T836C), A887T			
pSE575	D48E, A89T, L136P, R163Q, G179S	49	217	0.23
	T317A, G438A, T580C, G661A, (C704T), G708A, (G965A)			
pSE576	D48E, A89T, L136P, R163Q, G179S	44	197	0.22
	T317A, G438A, T580C, G661A, G708A			
pSE577	D48E, A89T, S138T, G179S	36	140	0.25
	T317A, G438A, (T497C), T585A, G708A			
pSE578	D48E, A89T, L136P, R163Q, G179S, E238D	45	193	0.23
	T317A, G438A, (T497C), T580C, G661A, G708A, A887T			

ФИГ.6J

ПЛАЗМИДА	МУТАЦИИ	[B2]	[B1]	B2/B1
pSE582 ca	V3L, L136M	186	178	1.04
pSE583 cb	G26A, D48Y, R75W, S93N	94	88	1.07
pSE584 cc	R71L	314	293	1.07
pSE585 cd	T471, W110L, A139T	168	189	0.89
pSE586 ce	V1041, S138T, V2201, F2341	150	138	1.10
pSE587 cf	G45R, A64V, R69K	182	192	0.95
pSE588 cg	S90N	251	243	1.03
pSE589 ch	G26D, W111OL, R233H	97	107	0.91
pSE590 ci	Q36R, V1041, P128S, C152W, T276A	194	171	1.13
pSE591 ci	S90N	164	147	1.12
pSE592 ck	C142Y, A302T	152	133	1.14
pSE593 cl	V2M, V56D	117	121	0.97
pSE594 cm	S41G, L87V, A139T, L206M,	122	212	0.58
pSE595 cn	A62V, A139D	150	122	1.23
pSE596 co	F176C	203	204	1.0
pSE597 cp	T149S	120	135	0.89
pSE598 cq	A64T, C142Y	105	90	1.17
pSE599 cr	A130V, C142Y, L224M, E238V, L293M	79	71	1.11
pSE600 cs	A16T, K154M, L206F	103	97	1.06

ФИГ.6К

Плазмида	МУТАЦИИ	[B2]	[B1]	[B2/B1]
pSE601 da	S41G, D48E, A61T, R71L, A89T, L136M, S138T, A139T, T149S. G179S, V196A, E238D, F278L, P289L	17	137	0.12
pSE602 db	S41G, D48E, A61T, R71L, A89T, L136M, S138T, A139T, T149S. F176C, G179S, V196A, E238D, P289L	17	87	0.19
pSE603 dc	D48E, R71L, A89T, L136P, T149S. F176C, G179S, E238D, I280V	19	146	0.13
pSE604 dd	D48E, A61T, R71L, W110L, T149S, G179S, V196A, L206M, E238D, V271A, I280V	26	180	0.14
pSE605 de	D48E, A61T, R71L, A89T, L136M, S138T, A139T, T149S. G179S, V196A, E238D, H279Q, P289L	22	158	0.14
pSE606 df	D48E, A61T, R71L, A89T, L136M, S138T, A139T, T149S. G179S, V196A, E238D, G287E, P289Q	16	94	0.17
pSE607 dg	D48E, A61T, R71L, A89T, L136M, S138T, A139T, T149S. G179S, V196A, E238D, P289L	21	243	0.13
pSE608 dh	D48E, A61T, R71L, A89T, A139T, T149S. F176C, G179S, V196A, E238D, V285G, P289L	18	146	0.12
pSE609 di	Q38R, D48E, A61T, R71L, L87V, A89T, L136M, S138T, A139T, T149S. G179S, V196A, E238D, P289L	20	150	0.13
pSE610 dj	D48E, A61T, L87V, A89T, W110L,, S138T, A139T, T149S. G179S, V196A, E238D, P289L	14	110	0.13
pSE611 dk	D48E, A61T, R71L, A89T, L136M, S138T, A139T, T149S. G179S, V196A, E238D, P289L	25	184	0.14
pSE612 di	D48E, A89T, L136P, K154E, G179S, S231L, E238D	16	132	0.12

ФИГ.6L

ПЛАЗМИДА	МУТАЦИИ	[B2]	[B1]	B2/B1
pSE617 ea	D48E, A61T, R711, A89T, 1136P, T149S, F176C, G179S, V196A, E238D, 1280V	4	86	0.05
pSE620 eb	D48E, R711, A89T, 1136P, T149S, F176C, G179S, E238D, 1280V	17	179	0.08
pSE621 ec	Q36P, D48E, A61T, R71L, A89T, L136P, T149S, F176C, G179S, V196A, E238D, 1280V	12	204	0.06
pSE622 ed	D48E, A61T, R711, A89T, A139T, T149S, F176C, G 179S, V196A, E238D, 1280V	16	226	0.07
pSE639 ee	V2M, D48E, A61T, R71L, A89T, L136P, T149S, F176C, G179S, V196A, E238D, 1280V	15	225	0.07
pSE643 ef	D48E, A61T, R71L, A89T, L136P, T149S, F176C, G179S, V196A, E238D, 1280V, A302T	19	247	0.08
pSE646 eg	D48E, R71L, A89T, L136P, T149S, F176C, G179S, E238D, P289L	7	100	0.06
pSE655 eh	D48E, R71L, A89T, L136P, T149S, F176C, G179S, E238D, A302T	10	139	0.07
pSE657 ei	D48E, R71L, A89T, 1136P, T149S, F176C, G179S, V196A, E238D, 1280V	9	157	0.06
pSE659 ej	D48E, A61T, R71L, A89T, L136P, T149S, F176C, G179S, V196A, E238D	7	105	0.06
pSE670 ek	V2M, D48E, R71L, A89T, L136P, T149S, F176C, G179S, V196A, E238D, 1280V	7	104	0.07
pSE682 el	D48E, A61T, R71L, A89T, L136P, T149S, R162H, F176C, G179S, V196A, E238D, 1280V	4	83	0.05
pSE683 em	D48E, R71L, A89T, V120A, L136P, T149S, K154E, G179S, S231L, E238D	8	154	0.05
pSE684 en	D48E, R71L, A89T, V120A, L136P, T149S, F176C, G179S, S231L, E238D, 1280V	11	155	0.07
pSE685 eo	D48E, A61T, R71L, L87V, A89T, S90N, A139T, T149S, F176C, G179S, V196A, E238D, V285G, P289L	11	134	0.08
pSE686 ep	D48E, A61T, R71L, L87V, A89T, A139T, T149S, F176C, G179S, V196A, E238D, V285G, P289L	8	100	0.08
pSE579 eq	D48E, R71L, A89T, L136P, K154E, G179S, S231L, E238D	16	178	0.09
pSE580 er	D48E, R71L, A89T, V120A, L136P, K154E, F176C, G179S, S231L, E238D	14	149	0.09
pSE581 es	D48E, R71L, A89T, V120A, L136P, T149S, K154E, F176C, G179S, S231L, E238D	8	146	0.06

ФИГ.6М