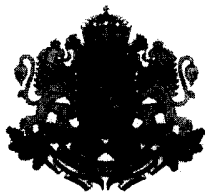


РЕПУБЛИКА БЪЛГАРИЯ



(19) BG

ЗАЯВКА ЗА ПАТЕНТ
ЗА
ИЗОБРЕТЕНИЕ

(11) 106479A

(51) Int.Cl.

C12N 15/09 C12N 1/21 C12N
9/88 C12N 15/60 C12N 15/76
C12P 17/18 C12P 19/44 C12P
19/62 C12R 1/465

ПАТЕНТНО ВЕДОМСТВО

(21) Заявителски № 106479 (22) Заявено на 05.03.2002 (24) Начало на действие на патента от: Приоритетни данни (31) 60/148645 (32) 12.08.1999 (33) US (41) Публикувана заявка в бюлетин № 10 31.10.2002 (45) Отпечатано на (46) Публикувано в бюлетин № на (56) Информационни източници: (62) Разделена заявка от рег. №	(71) Заявител(и): ZOETIS P LLC , , FLORHAM PARK, NEW JERSEY 07932 , 100 CAMPUS DRIVE (US) ; (72) Изобретател(и): CHEN , Yan . , 95051 Santa Clara CALIFORNIA (US) ; GUSTAFSSON , Claes . , 94002 Belmont CALIFORNIA (US) ; KREBBER , Anke . , 94043 Mountain View CALIFORNIA (US) ; MINSHULL , Jeremy S . , 94025 Menlo Park CALIFORNIA (US) ; RAILLARD , Sun A . , 94043 Mountain View CALIFORNIA (US) ; STUTZMAN-ENGWALL , Kim J . , 06340 Groton CONNECTICUT (US) ; (74) Представител по индустриална собственост: Румяна Стефанова Слабова , 1124 София , ул. "Леонардо да Винчи" 3 (86) № на PCT заявка: PCT/ IB00/01017 , 24.07.2000 (87) № и дата на PCT публикация: WO01/12821 , 22.02.2001
--	---

(54) STREPTOMYCES AVERMITILIS ГЕН НАСОЧВАЩ ОТНОШЕНИЕТО B2:B1
АВЕРМЕКТИНИ

(57) Изобретението се отнася до полинуклеотидни молекули, съдържащи нуклеотидни последователности, кодиращи aveC генен продукт. Полинуклеотидните молекули могат да бъдат използвани с цел да променят отноше нието или количеството на клас 2:1 авермектини, произведени във ферментационни култури от S. avermitilis. Изобретението се отнася и до вектори, клетки-гостоприемници и мутантни щамове на S. avermitilis, при които aveC генът е инактивиран или мутиран така, че да променя отношението или количеството на клас 2:1 произведени авермектини. 81 претенции

BG 106479 A

05.03.02

STREPTOMYCES AVERMITILIS ГЕН

НАСОЧВАЩ ОТНОШЕНИЕТО НА B2:B1 АВЕРМЕКТИНИ

2094/02 PC

1. ОБЛАСТ НА ТЕХНИКАТА

Настоящото изобретение е насочено към препарати и методи за произвеждане на авермектини и първично е свързано със здравето на животните. По-специално, настоящето изобретение се отнася за полинуклеотидни молекули, съдържащи нуклеотидни последвателности, кодиращи един AveC генен продукт, който може да бъде използван да модулира отношението на клас 2:1 авермектини, произведени чрез ферментация на култури от *Streptomyces avermitilis* и за препарати и методи за подбор на такива полинуклеотидни молекули. По-нататък настоящето изобретение се отнася за вектори, трансформирани клетки гостоприемници и нови мутантни щамове от *S. avermitilis*, в които aveC генът е мутиран така, че да модулира отношението на клас 2:1 произведени авермектини.

2. ПРЕДШЕСТВУВАЩО СЪСТОЯНИЕ НА ТЕХНИКАТА

2.1. Авермектини

Видовете *Streptomyces* произвеждат голямо разнообразие от вторични метаболити, включително авермектини, които обхващат една серия от осем свързани шестнадесет-членни макроциклични лактони, притежаващи мощна противохелминтна и инсектицидна активност. Осемте различни, но близко свързани съединения са означени като A1a, A1b, A2a, A2b, B1a, B1b, B2a и B2b. Сериите "a" съединения се отнасят за природен авермектин, където заместителят в позиция C25 е (S)-сек-бутил и "b" сериите се отнасят за такива съединения, където заместителят в позиция C25 е изопропил. Обозначенията "A" и "B" се отнасят за авермектини, където заместителят в позиция C5 е съответно метокси и хидрокси.

Номерацията "1" се отнася за авермектини, където една двойна връзка се намира в C22,23 позиция и номерацията "2" се отнася за авермектини, притежаващи един водород в позиция C22 и една хидроксигрупа в позиция C23. Измежду сродните авермектини, B1 типът авермектин е разпознат, като притежаващ най-ефективната антипаразитна и пестицидна активност и следователно е търговски най-желаният авермектин.

Авермектините и тяхното производство чрез аеробна ферментация на щамове от *S. avermitilis*, са описани в United States Patents 4,310,519 и 4,429,042. Биосинтезата на природни авермектини се счита, че е инициирана ендогенно от CoA тиаостерните аналози на изомаслена киселина и S-(+)-2-метилмаслена киселина.

Подобрение от комбинация на два щамове чрез случайна мутагенеза и използването на екзогенно доставени мастни киселини, води до ефективно производство на авермектинови аналози. Мутанти на *S. avermitilis*, които са дефицитни на разклонена-верига 2-оксокисела дехидрогеназа (bkd дефицитни мутанти) могат само да произвеждат авермектини когато ферментациите са допълнени с мастни киселини. Подбор и изолиране на дефицитни на разклонена-верига дехидрогеназна активност (например, *S. avermitilis*, ATCC 53567) са описани в European Patent (EP) 276103. Ферментация на такива муантанти в присъствие на екзогенно доставени мастни киселини, има за резултат получаване само на четирите авермектини, съответстващи на използваните мастни киселини. Така, допълвайки ферментации на *S. avermitilis* (ATCC 53567) със S-(+)-метилмаслена киселина, има за резултат получаване на природните A1a, A2a, B1a и B2a; допълвайки ферментациите с изомаслена киселина се получават природните авермектини A1b, A2b, B1b и B2b; и допълвайки ферментациите с циклопентанкарбоксилска киселина

има за резултат получаване на четирите нови циклопентил-авермектини A1, A2, B1 и B2.

Ако добавката е с други мастни киселини, получават се нови авермектини. Чрез подбор на повече от 800 потенциални предшественици, са идентифицирани повече от 60 други нови авермектини. (Виж например, Dutton et al., 1991, J.Antibiot. 44:357-365; и Banks et al., 1994, Roy.Soc.Chem. 147:16-26). В допълнение, мутанти на *S. avermitilis*, дефицитни на 5-О-метилтрансферазна активност, произвеждат по същество само В аналог авермектините. Следователно, *S. avermitilis* мутанти, които нямат разклонена-верига 2-оксо кисела дехидрогеназна и 5-О-метилтрансферазна активност, произвеждат само В авермектините, които съответствуват на използваните мастни киселини като добавка при ферментацията. Така, допълвайки такива двойни мутанти със S-(+)-2-метилмаслена киселина се получават само природните авермектини B1a и B2a, докато допълването с изомаслена киселина или циклопентанкарбоксилова киселина води до получаване на природните авермектини B1b и B2b или съответно на новите циклопентил B1 и B2 авермектини. Допълване на двойно мутантния щам с циклохексан карбоксилова киселина, е предпочитан метод за производство на търговски важният нов авермектин циклохексилавермектин B1 (дорамектин). Изолирането и характеристиките на такива двойни мутанти, например *S. avermitilis* (ATCC 53692), са описани в EP 276103.

2.2. Гени участващи в биосинтеза на авермектин

В много случаи, гени участващи в получаване на вторични метаболити и гени кодиращи даден антибиотик, са открити заедно групирани в хромозомата. Такъв е случаят например, със *Streptomyces* поликетид синтаза генното групиране (PKS) (виж

Hopwood and Sherman, 1990, Ann.Rev.Genet. 24:37-66). Така, една стратегия за клониране на гени в биосинтетичен път, е била да се изолира резистентен към лекарство ген и след това да се тестват съседни области на хромозомата за други гени, свързани с биосинтезата на този даден антибиотик. Друга стратегия за клониране на гени, включени в биосинтезата на важни метаболити е комплементация на мутанти. Например, части от ДНК библиотека на даден организъм, способни да произвеждат определени метаболити, са въвеждани в не-произвеждащи мутанти и трансформанти, подбрани за произвеждане на метаболитите. В допълнение, хибридизация на библиотека, като се използват сонди, произхождащи от други видове *Streptomyces*, са използвани за идентифициране и клониране на гени при биосинтетичните пътища.

Гени участващи в биосинтезата на авермектин (*ave* гени), като гените необходими за биосинтеза на други вторични метаболити на *Streptomyces* (например, PKS), са открити групирани в хромозомата. Известен брой *ave* гени успешно са клонирани, като са използвани вектори комплементарни на *S. avermitilis* мутанти, блокирани при авермектин биосинтеза. Клонирането на такива гени е описано в U.S.Patent 5,252,474. В допълнение, Ikeda et al., 1995, *J.Antibiot.* 48:532-534, описва локализацията на хромозомна област, включваща C22,23 дехидриращия етап (*aveC*) спрямо един 4.82 Kb *Bam*HI фрагмент на *S. avermitilis*, както и мутации в *aveC* гена, което има за резултат получаването на единствен компонент B2a производител. Тъй като авермектин, едно мощно противохелминтно съединение, може да бъде получен химически от авермектин B2a, такъв единствен компонент производител на авермектин B2a, се разглежда като особено полезен за търговско производство на авермектин.

05.03.02

Идентифицирането на мутации в *aveC* гена, които минимализират сложността на авермектин производството, като например, мутации, които намаляват B2:B1 отношението на авермектини, би опростило производството и пречистването на търговски важни авермектини.

ТЕХНИЧЕСКА СЪЩНОСТ НА ИЗОБРЕТЕНИЕТО

Настоящото изобретение предоставя изолирана полинуклеотидна молекула, съдържащата цялата *aveC* ORF на *S. avermitilis* или значителна част от нея, която изолирана полинуклеотидна молекула няма следващата пълна ORF (отворена рамка за четене), която е локализирана след *aveC* ORF *in situ* в *S. avermitilis* хромозомата. Изолираната полинуклеотидна молекула на настоящето изобретение предпочитано съдържа нуклеотидна последователност, която е същата като *S. avermitilis* AveC генен продукт-кодиращата последователност на плазмид pSE186 (ATCC 209604), или която е същата като нуклеотидната последователност на *aveC* ORF от ФИГУРА 1 (SEQ ID NO:1), или значителна част от нея. Настоящото изобретение по-нататък предоставя изолирана полинуклеотидна молекула, съдържаща нуклеотидната последователност на SEQ ID NO:1 или нейин дегенериран вариант.

Настоящото изобретение по-нататък предоставя изолирана полинуклеотидна молекула, притежаваща нуклеотидна последователност, която е хомоложна на *S. avermitilis* AveC генен продукт-кодираща последователност на плазмид pSE186 (ATCC 209604), или на нуклеотидната последователност на *aveC* ORF, представена на ФИГУРА 1 (SEQ ID NO: 1), или значителна част от нея.

По-нататък настоящето изобретение предоставя изолирана полинуклеотидна молекула, включваща нуклеотидна последователност, кодираща един AveC хомолог генен продукт. В

предпочитано изпълнение, изолираната полинуклеотидна молекула, съдържа нуклеотидна последователност, кодираща AveC хомолог генен продукт от *S.hygroscopicus*, който хомоложен генен продукт съдържа аминокиселинната последователност на SEQ ID NO:4 или значителна част от нея. В едно предпочитано изпълнение, изолираната полинуклеотидна молекула на настоящето изобретение, която кодира *S.hygroscopicus* AveC хомолог генен продукт съдържа нуклеотидната последователност на SEQ ID NO:3 или значителна част от нея.

По-нататък настоящето изобретение предоставя изолирана полинуклеотидна молекула, съдържаща нуклеотидна последователност, която е хомоложна на *S.hygroscopicus* нуклеотидната последователност на SEQ ID NO:3. Настоящото изобретение по-нататък предоставя изолирана полинуклеотидна молекула, съдържаща нуклеотидна последователност, която кодира полипептид, който е хомоложен на *S.hygroscopicus* AveC хомолог генен продукт, притежаващ аминокиселинната последователност на SEQ ID NO:4.

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

По-нататък настоящето изобретение предоставя рекомбинантни клониращи вектори и експресионни вектори, които са полезни при клониране или експресия на полинуклеотид на настоящето изобретение, включително полинуклеотидни молекули съдържащи aveC ORF на *S.avermitilis* или един aveC хомолог ORF. В

05.03.03

едно неограничаващо изпълнение, настоящето изобретение предоставя плазмид pSE186 (ATCC 209604), който съдържа цялата ORF на *aveC* гена от *S. avermitilis*. Настоящото изобретение предоставя освен това трансформирани клетки гостоприемници, съдържащи полинуклеотидна молекула или рекомбинантен вектор на изобретението и техни нови производни щамове или клетъчни линии.

Настоящото изобретение предоставя по-нататък рекомбинантно експресиран AveC генен продукт или AveC хомолог генен продукт, или съществена част от него, който е съществено пречистен или изолиран, както и техни хомолози. Настоящото изобретение по-нататък предоставя метод за произвеждане на рекомбинантен AveC генен продукт, характеризиращ се с това че се култивира клетка гостоприемник, трансформирана с рекомбинантен експресионен вектор, споменатият рекомбинантен експресионен вектор включва полинуклеотидна молекула, притежаваща нуклеотидна последователност, кодираща един AveC генен продукт или AveC хомолог генен продукт, която полинуклеотидна молекула е оперативно свързана с един или повече регулаторни елементи, които контролират експресията на полинуклеотидната молекула в клетката гостоприемник, в условия насочващи произвеждането на рекомбинантен AveC генен продукт или AveC хомолог генен продукт и добиване на AveC генния продукт или AveC хомолог генен продукт от клетъчната култура.

Настоящото изобретение по-нататък предоставя полинуклеотидна молекула, съдържаща нуклеотидна последователност, която от друга страна е същата както *S. avermitilis* AveC алела или AveC генен продукт-кодиращата последователност на плазмид pSE186 (ATTC 20904), или негов дегенериран вариант, или нуклеотидната последователност на *aveC* ORF на *S. avermitilis*, както е представено на ФИГУРА 1 (SEQ ID NO:1) или негов дегенериран

вариант, но който по-нататък съдържа една или повече мутации, така че клетки на *S. avermitilis* щам ATCC 53692, при които дивия-тип *aveC* алел е инактивиран и които експресират полинуклеотидната молекула, съдържаща мутантната нуклеотидна последователност, произвеждат различно отношение или количество авермектини, в сравнение с произведените от клетки на *S. avermitilis* щам ATCC 53692, които вместо това експресират само дивия-тип *aveC* алел. Съгласно настоящето изобретение, такива полинуклеотидни молекули могат да бъдат използвани да произвеждат нови щамове *S. avermitilis*, които проявяват забележима промяна в производството на авермектин, в сравнение със същия щам, който вместо това експресира само дивия-тип *aveC* алел. В едно предпочитано изпълнение, такива полинуклеотидни молекули са полезни за получаване нови щамове на *S. avermitilis*, които произвеждат авермектини в редуциран клас 2:1 отношение, в сравнение със същия щам, който вместо това експресира само дивия-тип *aveC* алел. В следващо предпочитано изпълнение, такива полинуклеотидни молекули са полезни за получаване на нови щамове от *S. avermitilis*, които произвеждат повишени нива авермектини в сравнение със същия щам, който вместо това експресира само единствен див-тип *aveC* алел. В следващо предпочитано изпълнение, такива полинуклеотидни молекули са полезни за получаване на нови щамове *S. avermitilis*, при които *aveC* генът е инактивиран.

Настоящото изобретение предоставя методи за идентифициране мутанти на *aveC* ORF на *S. avermitilis*, способни да променят отношението и/или количеството на произведените авермектини. В предпочитано изпълнение, настоящето изобретение предоставя метод за идентифициране мутации на *aveC* ORF, способни да променят клас 2:1 отношението на произведените авермектини, характеризиращ се с това, че: (а) се определя клас 2:1 отношението

авермектини, произведени с клетки на един щам от *S. avermitilis*, в който присъщият *aveC* алелът е инактивиран и в който полинуклеотидната молекула, съдържаща една нуклеотидна последователност, кодираща мутантен *AveC* генен продукт, е въведена и експресирана; (b) се определя клас 2:1 отношението авермектини, произведени от клетките на същия щам на *S. avermitilis* както в етап (a), но който вместо това експресиращ само дивия-тип *aveC* алел или ORF от ФИГУРА1 (SEQ ID NO:1), или нуклеотидна последователност, която е хомоложна на него; и (c) се сравнява клас 2:1 отношението на авермектини, произведени с *S. avermitilis* клетки в етап (a) с клас 2:1 отношението авермектини, произведени със *S. avermitilis* клетки от етап (b); така че ако клас 2:1 отношението на авермектини, произведени от *S. avermitilis* клетки на етап (a) е различно от клас 2:1 отношението на авермектини, произведени от *S. avermitilis* клетки на етап (b), тогава е идентифицирана една мутация на *aveC* ORF, способна да променя клас 2:1 отношението на авермектини. В едно предпочитано изпълнение, клас 2:1 отношението на авермектини е редуцирано от мутацията.

В следващо предпочитано изпълнение, настоящото изобретение предоставя метод за идентифициране мутации на *aveC* ORF или генетични конструкти, съдържащи *aveC* ORF, способни да променят количеството произведени авермектини, характеризиращ се с това, че : (a) се определя количеството произведени авермектини от клетки на един щам *S. avermitilis*, в който присъщият *aveC* алел е инактивиран, и в който полинуклеотидна молекула съдържаща нуклеотидна последователност, кодираща мутантен *AveC* генен продукт или съдържаща генетичен конструкт, включващ нуклеотидна последователност, кодираща *AveC* генен продукт, е въведена и е експресирана; (b) се определя количеството авермектини, получени от клетки на същия щам от *S. avermitilis* както в етап (a), но който

вместо това експресира само единствен *aveC* алел, притежаващ нуклеотидната последователност на ORF от ФИГУРА 1 (SEQ ID NO:1) или нуклеотидна последователност, която е хомоложна на нея; и (с) се сравнява количеството авермектини, получени от клетки на *S. avermitilis* от етап (а) с количеството авермектини, получено от клетки на *S. avermitilis* на етап (b); така че ако количеството авермектини, получено от клетки на *S. avermitilis* на етап (а) е различно от количеството авермектини, получено от клетки на *S. avermitilis* на етап (b), тогава е идентифицирана една мутация на *aveC* ORF или генетичен конструкт, способен да променя количеството авермектини. В предпочитано изпълнение, клас 2:1 отношението на авермектини е редуцирано от мутацията.

По-нататък настоящето изобретение предоставя рекомбинантни вектори, които са полезни за получаване на нови щамове *S. avermitilis*, които имат променено производство на авермектин. Например, настоящото изобретение предоставя вектори, които могат да бъдат използвани да прицелват всяка от полинуклеотидните молекули, съдържащи мутантните нуклеотидни последователности на настоящото изобретение, на мястото на *aveC* гена на *S. avermitilis* хромозомата, за да вмъкнат или заменят *aveC* алела или ORF или част от тях с хомоложна рекомбинация. Съгласно настоящото изобретение обаче, полинуклеотидна молекула съдържаща мутантна нуклеотидна последователност на настоящото изобретение предоставена тук, може също да функционира като модулира биосинтезата на авермектин, когато е включена чрез инсерция в хромозомата на *S. avermitilis*, на място различно от *aveC* гена, или когато е подържан епизомно в *S. avermitilis* клетки. Така, настоящото изобретение предоставя също вектори, включващи полинуклеотидна молекула, съдържаща мутантна нуклеотидна последователност на настоящото изобретение, които вектори могат да бъдат използвани

да включат чрез инсерция полинуклеотидната молекула на място в *S. avermitilis* хромозомата, различно от *aveC* гена или да бъде подържана епизомно. В предпочитано изпълнение, настоящото изобретение предоставя вектори за генна замяна, които могат да бъдат използвани да включват чрез инсерция мутантен *aveC* алел в хромозомата на *S. avermitilis*, за да се създадат нови щамове от клетки, които произвеждат авермектини в един редуциран клас 2:1 отношение, сравнени с клетките на същия щам, който вместо това експресира само дивия-тип *aveC* алел.

По-нататък, настоящото изобретение предоставя методи за получаване на нови щамове от *S. avermitilis*, характеризиращи се с това, че клетки, които експресират мутантен *aveC* алел и които произвеждат променено отношение и/или количества авермектини, са сравнени с клетки на същия щам от *S. avermitilis*, който вместо това експресира само дивия-тип *aveC* алел. В предпочитано изпълнение, настоящото изобретение предоставя метод за получаване на нови щамове от *S. avermitilis*, характеризиращ се с това, че клетки, които експресират мутантен *aveC* алел и които произвеждат променено клас 2:1 отношение авермектини, са сравнени с клетки на същия щам от *S. avermitilis*, които вместо това експресират само дивия-тип *aveC* алел, включващ трансформиращи клетки от един щам на *S. avermitilis* с вектор, който носи мутантен *aveC* алел, кодиращ генен продукт, който променя клас 2:1 отношението на авермектини, произведени от клетки на един щам *S. avermitilis*, експресиращи мутантен алел, сравнени с клетки от същия щам, които вместо това експресират само дивия-тип *aveC* алел и подбирайки трансформирани клетки, които произвеждат авермектини в един променен клас 2:1 отношение, сравнени с клас 2:1 отношението, получено от клетки на щам, който вместо това експресират дивия-тип *aveC* алел. В предпочитано

изпълнение, клас 2:1 отношението на получени авермектини е редуцирано в клетките на новия щам.

В следващо предпочитано изпълнение, настоящото изобретение предоставя метод за получаване на нови щамове *S. avermitilis*, характеризиращ се с това, че клетки, които произвеждат променени количества авермектин, включващи трансформиращи клетки на един щам от *S. avermitilis* с вектор, който носи мутантен *aveC* алел или генетичен конструкт, съдържащ *aveC* алела, експресията, на който има за резултат променено количество авермектини, произведени от клетки на щам от *S. avermitilis*, експресиращи мутантния *aveC* алел или генетичен конструкт, в сравнение с клетки на същия щам, които вместо това експресират само дивия-тип *aveC* алел и подбирайки трансформирани клетки, които произвеждат авермектини в променено количество в сравнение с количеството авермектини, получено от клетките на щама, който вместо това експресира само дивия-тип *aveC* алел. В предпочитано изпълнение, количеството получени авермектини е повишено в клетки от новия щам.

В следващо предпочитано изпълнение, настоящото изобретение предоставя метод за получаване на нови щамове *S. avermitilis*, клетките на които съдържат инактивиран *aveC* алел, характеризиращ се с това, че се трансформират клетки на един щам от *S. avermitilis*, които експресират който и да е *aveC* алел с вектор, който инактивира *aveC* алела и се отбират трансформирани клетки, в които *aveC* алелът е инактивиран.

По-нататък, настоящото изобретение предоставя нови щамове от *S. avermitilis*, включващи клетки, които са трансформирани с всяка от полинуклеотидните молекули или вектори, съдържащи мутантна нуклеотидна последователност на настоящото изобретение. В предпочитано изпълнение, настоящото изобретение предоставя

нови щамове от *S. avermitilis*, включващи клетки, които експресират мутантен *aveC* алел на мястото на, или в допълнение на дивия-тип *aveC* алел, където клетките на новия щам произвеждат авермектини в един променен клас 2:1 отношение, в сравнение с клетки на същия щам, които вместо това експресират само дивия-тип *aveC* алел. В предпочитано изпълнение, клетките на новия щам произвеждат авермектини в редуциран клас 2:1 отношение, в сравнение с клетки от същия щам, които вместо това експресират само дивия-тип *aveC* алел. Такива нови щамове са полезни при производството в голям мащаб на търговски търсени авермектини като дорамектин.

В следващо предпочитано изпълнение, настоящото изобретение предоставя нови щамове от *S. avermitilis*, включващи клетки, които експресират мутантен *aveC* алел или генетичен конструкт, съдържащ *aveC* алела, на мястото на, или в допълнение на, присъщия му *aveC* алел, което води до производство от клетките на променено количество авермектини, в сравнение с количеството авермектини, произведено от клетки от същия щам, които вместо това експресират само дивия-тип *aveC* алел. В предпочитано изпълнение, новите клетки произвеждат повишено количество авермектини.

В следващо предпочитано изпълнение, настоящото изобретение предоставя нови щамове от *S. avermitilis*, включващи клетки, при които *aveC* генът е инактивиран. Такива щамове са полезни поради различния спектър от авермектини, които те произвеждат в сравнение с дивия-тип щам, и при комплементационни тестове за отбор, както е описано тук, за определяне дали прицелна или случайна мутагенеза на *aveC* гена, повлиява производството на авермектин.

Настоящото изобретение по-нататък предоставя процес за производство на авермектини, характеризиращ се с това, че се

култивират клетки от един щам на *S. avermitilis*, които клетки експресират мутантен *aveC* алел, който кодира генен продукт, променящ клас 2:1 отношението на авермектини, произведени от клетки на щам *S. avermitilis*, експресиращ мутантния *aveC* алел, в сравнение с клетки на същия щам, които не експресират мутантния *aveC* алел, но вместо това експресират само дивия-тип *aveC* алел, в среда за култивиране, при условия позволяващи или индуциращи от това производството на авермектини и добиване на споменатите авермектини от културата. В предпочитано изпълнение, клас 2:1 отношението на авермектини, произведени от клетки експресиращи мутацията, е редуцирано. Този процес осигурява повишена ефективност на производството на търговски значими авермектини, като дорамектин.

Настоящото изобретение по-нататък предоставя процес за производство на авермектини, характеризиращ се с това, че се култивират клетки от един щам на *S. avermitilis*, които клетки експресират мутантен *aveC* алел или генетичен конструкт, съдържащ *aveC* алел, което води до получаване на променено количество авермектини, произведени от клетки на щам *S. avermitilis*, експресиращи мутантния *aveC* алел или генетичен конструкт, в сравнение с клетки на същия щам, които не експресират мутантния *aveC* алел или генетичен конструкт, но вместо това експресират само дивия-тип *aveC* алел, в среда за култивиране при условия позволяващи или индуциращи това производството на авермектини и добиване на споменатите авермектини от културата. В предпочитано изпълнение, количеството авермектини произведено от клетки, експресиращи мутацията или генетичен конструкт, е повишено.

Настоящото изобретение по-нататък предоставя нови препарати авермектини, произведени от щам на *S. avermitilis*, експресиращ мутантен *aveC* алел на настоящото изобретение, където

авермектините са произведени в редуциран клас 2:1 отношение, в сравнение с клас 2:1 отношението на авермектини, произведени от клетки на същия щам от *S. avermitilis*, които не експресират мутантния *aveC* алел, но вместо това експресират само дивия-тип *aveC* алел. Новият авермектин препарат може да бъде представен като получен във ферментационна културелна течност, или може да бъде добит от нея и може частично или значително да бъде пречистен от нея.

4. КРАТКО ОПИСАНИЕ НА ФИГУРИТЕ

ФИГУРА 1. ДНК последователност (SEQ ID NO:1) включваща *S. avermitilis aveC* ORF и произлизаща от нея аминокиселинна последователност (SEQ ID NO:2).

ФИГУРА 2. Плазмиден вектор pSE186 (ATCC 209604), съдържащ целия ORF на *aveC* гена от *S. avermitilis*.

ФИГУРА 3. Заместващ ген вектор pSE180 (ATCC 209605), съдържащ *ermE* гена на *Sacc. erythraea*, въведен чрез инсерция в *aveC* ORF на *S. avermitilis*.

ФИГУРА 4. *Bam*HI рестрикционна карта на авермектин поликетид синтаза генно групиране от *S. avermitilis*, с пет идентифицирани припокриващи се космидни клона (т.е. pSE65, pSE66, pSE67, pSE68, pSE69). Указана е също взаимозависимостта на pSE118 и pSE119.

ФИГУРА 5. HPLC анализ на ферментационните продукти, произведени с *S. avermitilis* щамове. Количественото определяне на максимума е изпълнено, чрез сравнение със стандартни количества циклохексил B1. Циклохексил B2 ретенционното време е 7.4-7.7 минути; циклохексил B1 ретенционното време е 11.9-12.3 минути. ФИГ. 5A. *S. avermitilis* щам SE180-11 с инактивиран *aveC* ORF. ФИГ. 5B. *S. avermitilis* щам SE180-11, трансформиран с pSE187. ФИГ. 5D. *S. avermitilis* щам SE180-11, трансформиран с pSE188.

ФИГУРА 6. Сравнение на производни аминокиселинни последователности, кодирани от *aveC* ORF на *S. avermitilis* (SEQ ID NO:2), на *aveC* хомолог частична ORF от *S. griseochromogenes* (SEQ ID NO: 5), и *aveC* хомолога ORF от *S. hygroscopicus* (SEQ ID NO:4). Валиновият остатък представен подсилено, е предполагаемото начално място за белтъка. Консервативни остатъци са представени с главни букви за хомология във всичките три последователности и с малки букви за хомология в 2 от 3-те последователности. Аминокиселинните последователности съдържат около 50% идентичност на последователността.

ФИГУРА 7. Хибриден плазмиден конструктор, съдържащ 564 bp (базови двойки) *BsaAI/KpnI* фрагмент от *S. hygroscopicus aveC* хомолог ген, въведен чрез инсерция в *BsaAI/KpnI* мястото в *S. avermitilis aveC* ORF.

5. ПОДРОБНО ОПИСАНИЕ НА ИЗОБРЕТЕНИЕТО

Настоящото изобретение се отнася за идентифициране и характеристика на полинуклеотидни молекули, притежаващи нуклеотидни последователности, които кодират AveC генен продукт от *Streptomyces avermitilis*, за конструиране на нови щамове от *S. avermitilis*, които могат да бъдат използвани за подбор на мутантни AveC генни продукти, за техния ефект върху произвеждането на авермектин и за откритието, че някои мутантни AveC генни продукти, могат да намаляват отношението B2:B1 авермектини, произведени от *S. avermitilis*. Като пример, изобретението е описано в разделите по-долу за полинуклеотидна молекула, притежаваща нуклеотидна последователност, която е същата като *S. avermitilis* AveC генен продукт-кодиращата последователност на плазмид pSE186 (ATCC 209604), или нуклеотидната последователност на ORF от ФИГУРА 1 (SEQ ID NO:1) и за полинуклеотидни молекули, притежаващи

мутантни нуклеотидни последователности, производни от тях и техни дегенерирани варианти. Обаче, принципите представени в настоящото изобретение, могат да бъдат аналогично приложени към други полинуклеотидни молекули, включително *aveC* хомолог гени от други видове *Streptomyces*, включително например, *S.hygroscopicus* и *S.griseochromogenes*, измежду други.

5.1. Полинуклеотидни молекули кодиращи

S.avermitilis AveC генния продукт

Настоящото изобретение предоставя изолирана полинуклеотидна молекула, съдържаща пълната *aveC* ORF на *S.avermitilis* или значителна част от нея, която полинуклеотидна молекула няма следващата ORF, която е локализирана след *aveC* ORF *in situ* в *S.avermitilis* хромозомата.

Изолираната полинуклеотидна молекула на настоящото изобретение предпочитано съдържа нуклеотидна последователност, която е същата като *S.avermitilis* AveC генен продукт-кодиращата последователност на плазмид pSE186 (ATCC 209604), или която е същата като нуклеотидната последователност на ORF от ФИГУРА 1 (SEQ ID NO:1) или съществена част от нея. Както тук е използвана "съществена част" от изолирана полинуклеотидна молекула, съдържаща нуклеотидна последователност кодираща *S.avermitilis* AveC генен продукт, означава изолирана полинуклеотидна молекула, съдържаща най-малко 70% от цялата *aveC* ORF последователност представена във ФИГУРА 1 (SEQ ID NO:1), и която кодира функционално еквивалентен AveC генен продукт. В това отношение, "функционално еквивалентен" AveC генен продукт е определен като генен продукт, който когато е експресиран в *S.avermitilis* щам ATCC 53692, в който естественият *aveC* алел е инактивиран, има за резултат производството на съществено същото отношение и

количество авермектини както произведеното от *S. avermitilis* щам ATCC 53692, който вместо това експресира само дивия-тип, функционален *aveC*, естествен за *S. avermitilis* щам ATCC 53692.

В допълнение към нуклеотидната последователност на *aveC* ORF, изолираната полинуклеотидна молекула на настоящото изобретение, може по-нататък да съдържа нуклеотидни последователности, които естествено ограничават *aveC* гена *in situ* в *S. avermitilis*, такива като тези ограничаващи нуклеотидни последователности, представени на ФИГУРА 1 (SEQ ID NO:1).

Настоящото изобретение по-нататък предоставя изолирана полинуклеотидна молекула, съдържаща нуклеотидната последователност на SEQ ID NO:1, или неин дегенериран вариант.

Както тук са използвани, термините "полинуклеотидна молекула", "полинуклеотидна последователност", "кодираща последователност", "отворена рамка за четене" и "ORF" са предиведени да се отнасят за ДНК и РНК молекули, които могат да бъдат едноверижни или двуверижни, и които могат да бъдат транскрибирани (презаписани) и транслирани (преведени) (ДНК), или преведени (РНК), в AveC генен продукт, както е описано по-долу, в AveC хомолог генен продукт, или в полипептид, който е хомоложен на AveC генен продукт или на AveC хомолог генен продукт, в подходяща клетъчна експресионна система-гостоприемник, когато се постави под контрола на съответни регулаторни елементи. Една кодираща последователност може да включва, но не се ограничава, до прокариотни последователности, кДНК последователности, геномни ДНК последователности и химически синтезирани ДНК и РНК последователности.

Нуклеотидната последователност представена на ФИГУРА 1 (SEQ ID NO:1) включва четири различни GTG кодони в позиции базови двойки (bp) 42, 174, 177 и 180. Както е описано в Раздел 9 по-

долу, множествени делеции на 5'областта от *aveC* ORF (ФИГУРА 1; SEQ ID NO:1) са конструирани, за да помогнат да се определи кой от тези кодони може да функционира в *aveC* ORF като начални места за белтъчна експресия. Делеция на първото GTG място при bp 42 не елиминира AveC активността. Допълнителна делеция на всички от GTG кодоните в позиции bp 174, 177 и 180 заедно елиминира AveC активност, което показва, че тази област е необходима за белтъчна експресия. Така, настоящото изобретение обхваща различна дължина *aveC* ORFs.

По-нататък, настоящото изобретение предоставя полинуклеотидна молекула, притежаваща нуклеотидна последователност, която е хомоложна на *S. avermitilis* AveC генен продукт-кодиращата последователност на плазмид pSE186 (ATCC 209604), или на нуклеотидната последователност на *aveC* ORF, представена във ФИГУРА 1 (SEQ ID NO:1) или съществена част от нея. Терминът "хомоложен", когато е използван да се отнася за полинуклеотидна молекула, която е хомоложна на *S. avermitilis* AveC генен продукт-кодираща последователност, означава полинуклеотидна молекула притежаваща нуклеотидна последователност: (a) която кодира същия AveC генен продукт както *S. avermitilis* AveC генен продукт-кодиращата последователност на плазмид pSE186 (ATCC 209604), или която кодира същия AveC генен продукт, както нуклеотидната последователност на *aveC* ORF, представена във ФИГУРА 1 (SEQ ID NO:1), но която включва една или повече затихнали (silent) промени на нуклеотидната последователност, съответно на дегенерирането на генетичния код (т.е. един дегенериран вариант); или (b) която хибридизира с комплемента на полинуклеотидна молекула, притежаваща нуклеотидна последователност, която кодира аминокиселната последователност, кодирана от AveC генен продукт-кодиращата последователност на плазмид pSE186 (ATCC 209604)

или която кодира аминокиселинната последователност представена на ФИГУРА 1 (SEQ ID NO:1) при условия на умерена строгост, т.е. хибридизация с филтър-свързана ДНК в 0.5 M NaHPO₄, 7% натриев додецил сулфат (SDS), 1mM EDTA на 65°C и измиване в 0.2xSSC/0.1% SDS на 42°C (виж Ausbuel 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 кодира функционално еквивалентен AveC генен продукт, както е определено по-горе. В предпочитано изпълнение, хомоложната полинуклеотидна молекула хибридизира с комплентарната на AveC генен продукт-кодиращата нуклеотидна последователност от плазмид pSE186 (ATCC 209604) или с комплементарната на нуклеотидната последователност на aveC ORF, представена във ФИГУРА 1 (SEQ ID NO:1) или съществена част от нея при условия на висока строгост, т.е. хибридизация с филтър-свързана ДНК в 0.5 M NaHPO₄, 7% SDS, 1mM EDTA на 65°C и измиване в 0.1 xSSC/0.1% SDS на 68°C (Ausubel et al., 1989 по-горе) и кодира функционално еквивалентен AveC генен продукт, както е определено по-горе.

Активността на един AveC генен продукт и на потенциални негови функционални еквиваленти, може да бъде определена с HPLC анализ на ферментационните продукти, както е описано в примерите по-долу. Полинуклеотидни молекули притежаващи нуклеотидни последователности, които кодират функционални еквиваленти на *S. avermitilis* AveC генния продукт включват природно срещащи се aveC гени, представени в други щамове *S. avermitilis*, aveC хомолог гени в други видове на *Streptomyces*, и мутантни aveC алели, природно срещащи се или генно инженерно създадени.

Настоящото изобретение по-нататък предоставя полинуклеотидна молекула, съдържаща нуклеотидна последователност, която кодира полипептид, притежаващ аминокиселинна последователност,

която е хомоложна на аминокиселинната последователност, кодирана от AveC генен продукт-кодиращата последователност на плазмид pSE186 (ATCC 209604), или аминокиселинната последователност от ФИГУРА , (SEQ ID NO:2) или съществена част от нея. Както тук е използвана "съществена част" от аминокиселинната последователност от ФИГУРА 1 (SEQ ID NO:2), означава полинуклеотид, съдържащ най-малко около 70% от аминокиселинната последователност представена на ФИГУРА 1 (SEQ ID NO:2) и която съставлява функционално еквивалентен AveC генен продукт, както е определено по-горе.

Както тук е използвано да се отнася за аминокиселинни последователности, които са хомоложни на аминокиселинната последователност на AveC генен продукт от *S. avermitilis*, терминът "хомоложен" се отнася за полипептид, който от друга страна притежава аминокиселинната последователност от ФИГУРА 1 (SEQ ID NO:2), но в който един или повече аминокиселинни остатъци са консервативно заменени с различен аминокиселинен остатък, където споменатата аминокиселинна последователност има най-малко 70%, по-предпочитано най-малко около 80% и най-предпочитано поне около 90% идентичност на аминокиселинната последователност с полипептида, кодиран от AveC генен продукт-кодиращата последователност на плазмид pSE186 (ATCC 209604) или аминокиселинната последователност от Фигура 1 (SEQ ID NO:2), както е определено с всякакъв стандартен алгоритъм за идентичност на аминокиселинна последователност, като BLASTP алгоритъм (GENBANK, NCBI) и където такива консервативни замени имат като резултат функционално еквивалентен генен продукт, както е определено по-горе. Консервативни аминокиселинни замени са добре известни в тази област. Правила за извършване на такива замени, включват тези описани от Dayhof, M.D., 1978, Nat.Biomed.Res.Found.,

Washington, D.C., Vol.5, Sup. 3, измежду други. По-специално, консервативни аминокиселинни замени са тези, които общо стават в рамките на семейство от аминокиселини, които са свързани в киселинността или полярността. Генетично кодирани аминокиселини общо са разделени на четири групи: (1) кисели = аспартата, глутамат; (2) основни = лизин, аргинин, хистидин; (3) не-полярни = аланин, валин, левцин, изолевцин, пролин, фенилаланин, метионин, триптофан; и (4) не-заредени полярни = глицин, аспаргин, глутамин, цистеин, серин, треонин, тирозин. Фенилаланин, триптофан и тирозин са класифицирани свързано като ароматни аминокиселини. Една или повече замени в рамките на всяка отделна група, например, на левцин с изолевцин или валин, или на аспартат с глутамат, или на треонин със серин, или на всеки друг аминокиселинен остатък със структурно свързан аминокиселинен остатък, например, аминокиселинен остатък с подобна киселинност или полярност, или със сходство в някои техни комбинации, ще имат общо незначим ефект върху функцията на полипептида.

Настоящото изобретение по-нататък предоставя изолирана полинуклеотидна молекула, съдържаща нуклеотидна последователност, кодираща aveC хомолог генен продукт. Както тук е използван, "AveC хомолог генен продукт" е определен като генен продукт, притежаващ най-малко около 50% идентичност на аминокиселинната последователност с един AveC генен продукт на *S. avermitilis*, съдържащ аминокиселинната последователност, кодирана от AveC генен продукт-кодиращата последователност на плазмид pSE186 (ATCC 209604), или аминокиселинната последователност представена на ФИГУРА 1 (SEQ ID NO:2), както е определена със стандартен алгоритъм за идентичност на аминокиселинна последователност, като BLASTP алгоритъм (GENBANK, NCBI). В едно неограничаващо изпълнение, AveC

хомолог генният продукт е от *S.hygroscopicus*, (описано в EP application 0298423; deposit FERM BP-1901) и включва аминокиселинната последователност на SEQ ID NO:4, или съществена част от нея. "Съществена част" на аминокиселинната последователност от SEQ ID NO:4, означава полипептид, съдържащ най-малко около 70% от аминокиселинната последователност на SEQ ID NO:4, и който съставлява функционално еквивалентен AveC хомолог генен продукт. "Функционално еквивалентен" AveC хомолог генен продукт е определен като генен продукт, който когато е експресиран в *S.hygroscopicus* щам FERM BP-1901, в който нативният aveC хомолог алел е инактивиран, има като резултат производството на същото по същество отношение и количество от милбемицини (milbemycins) каквито се произвеждат от *S.hygroscopicus* щам FERM BP-1901, експресиращ вместо това само дивия-тип, функционален aveC хомолог алел, присъщ на *S.hygroscopicus* щам FERM BP-1901. В едно неограничаващо изпълнение, изолираната полинуклеотидна молекула на настоящото изобретение, която кодира *S.hygroscopicus* AveC хомолог генен продукт, включва нуклеотидната последователност от SEQ ID NO:3 или съществена част от нея. В това отношение, "съществена част" от изолираната полинуклеотидна молекула, съдържаща нуклеотидната последователност от SEQ ID NO:3, означава изолирана полинуклеотидна молекула, съдържаща най-малко около 70% от нуклеотидната последователност на SEQ ID NO:3 и която кодира функционално еквивалентен AveC хомолог генен продукт, както е дефинирано непосредствено по-горе.

Настоящото изобретение по-нататък предоставя полинуклеотидна молекула, съдържаща нуклеотидна последователност, която е хомоложна на *S.hydroscopicus* нуклеотидната последователност от SEQ ID NO:3. Терминът "хомоложен" когато е използван да се отнася за полинуклеотидна молекула, съдържаща

нуклеотидна последователност, която е хомоложна на *S.hydroscopicus* AveC хомолог генен продукт-кодиращата последователност от SEQ ID NO:3, означава полинуклеотидна молекула притежаваща нуклеотидна последователност: (а) която кодира същия генен продукт, както нуклеотидната последователност от SEQ ID NO:3, но която включва една или повече заглъхващи промени на нуклеотидната последователност съответно на дегенерацията на генетичния код (т.е. един дегенериран вариант); или (b) която хибридизира с комплементарната на полинуклеотидната молекула, притежаваща нуклеотидна последователност, която кодира аминокиселинната последователност на SEQ ID NO:4, при условия на "умерена строгост", т.е. хибридизация с филтър-свързана ДНК в 0.5 M NaHPO₄, 7% SDS, 1mM EDTA на 65°C и измиване с 0.2xSSC/0.1% SDS на 42°C (виж Ausubel et al., по-горе) и кодира функционално еквивалентен AveC хомолог генен продукт, както е определено по-горе. В едно предпочитано изпълнение, хомоложната полинуклеотидна молекула хибридизира с комплементарната на AveC хомолог генен продукт-кодиращата нуклеотидна последователност на SEQ ID NO:3, в условия на "висока строгост", т.е. хибридизация с филтър-свързана ДНК в 0.5M NaHPO₄, 7% SDS, 1mM EDTA на 65°C и измиване в 0.1xSSC/0.1% SDS на 68°C (Ausubel et al., 1989, по-горе) и кодира функционално еквивалентен AveC хомолог генен продукт, както е определено по-горе.

Настоящото изобретение по-нататък предоставя полинуклеотидна молекула, съдържаща една нуклеотидна последователност, която кодира полипептид, който е хомоложен на *S.hydroscopicus* AveC хомолог генен продукт. Както тук е използвано да се отнася за полипептиди, които са хомолжни на AveC хомолог генния продукт на SEQ ID NO:4 от *S.hydroscopicus*, терминът "хомоложен" се отнася за полипептид, който от друга страна има

аминокиселинната последователност на SEQ ID NO:4, но в която един или повече аминокиселинни остатъци са консервативно заменени с различен аминокиселинен остатък, както е определено по-горе, където споменатата аминокиселинна последователност има най-малко около 70%, по-предпочитано най-малко около 80% и най-предпочитано най-малко около 90% идентичност на аминокиселинната последователност с полипептида от SEQ ID NO:4, както е определена с всеки стандартен алгоритъм за идентичност на аминокиселинна последователност, като BLASTP алгоритъм (GENBANK, NCBI), и където такава консервативна замяна има за резултат функционално еквивалентен AveC хомолог генен продукт, както е определено по-горе.

По-нататък настоящото изобретение предоставя олигонуклеотиди, които хибридизират с полинуклеотидна молекула, притежаваща нуклеотидната последователност от ФИГУРА 1 (SEQ ID NO:1) или SEQ ID NO:3, или с полинуклеотидна молекула, притежаваща нуклеотидна последователност, която е комплементарна на нуклеотидната последователност от ФИГУРА 1 (SEQ ID NO:1) или SEQ ID NO:3. Такива олигонуклеотиди са най-малко с дължина около 10 нуклеотида, и предпочитано от около 15 до около 30 нуклеотида дължина и хибридизират с една от гореспоменатите полинуклеотидни молекули при условия на "висока строгост", т.е. измиване в 6xSSC/0.5% натриев пирофосфат на ~ 37°C за ~14-базови олига, на ~48°C за ~17-базови олига, на ~55°C за ~20-базови олига и на ~60°C за ~23-базови олига. В предпочитано изпълнение, олигонуклеотидите са комплементарни на една част от една от гореспоменатите полинуклеотидни молекули. Тези олигонуклеотиди са полезни за различни цели, включително да кодират или действуват като антисенз молекули, полезни в генната регулация, или като праймери

при амплификация на *aveC* или *aveC* хомолог-кодиращи полинуклеотидни молекули.

Допълнителни *aveC* хомолог гени могат да бъдат идентифицирани в други видове или щамове на *Streptomyces*, като се използват полинуклеотидните молекули или олигонуклеотиди, представени тук във връзка с известни техники. Например, една олигонуклеотидна молекула съдържаща част от *S. avermitilis* нуклеотидната последователност от ФИГУРА 1 (SEQ ID NO:1) или част от *S. hygrosopicus* нуклеотидната последователност на SEQ ID NO:3 може да бъде откриваемо белязана и използвана за подбор на геномна библиотека, конструирана от ДНК, произхождаща от организъм, който е от интерес. Строгостта на условията за хибридизация е избрана въз основа на взаимозависимостта на референтния организъм, в този пример *S. avermitilis* или *S. hygrosopicus*, спрямо организма, който е от интерес. Изисквания за различни условия на строгост са добре известни на специалиста в тази област, и такива условия могат да варират предвиждайки в зависимост от спецификите на организмите, от които произхожда библиотеката и белязаните последователности. Такива олигонуклеотиди предпочитано са с около 15 дължина и включват, например тези описани в примерите по-долу. Амплификация на хомолог гени може да бъде изпълнена, като се използват тези и други олигонуклеотиди, прилагайки стандартни техники като полимеразна верижна реакция (PCR), въпреки че могат да бъдат използвани други техники за амплификация, известни в тази област, например, лигазна верижна реакция.

Клонове идентифицирани като съдържащи *aveC* хомолог нуклеотидни последователности, могат да бъдат тествани за способност да кодират функционален *AveC* хомолог генен продукт. За тази цел, клоновете могат да бъдат подложени на секвениращ

анализ, за да се идентифицира подходяща рамка за четене, както и инициращите и завършващите сигнали. Алтернативно или допълнително, клонираната ДНК последователност може да бъде включена чрез инсерция в подходящ експресионен вектор, т.е. вектор, който съдържа необходимите елементи за транскрипция и превеждане на включената белтък-кодираща последователност. Може да бъде използвана всяка система от едно разнообразие на гостоприемник/вектор системи, както е описано по-долу, включително, но неограничаващо до бактериални системи като плазмидни, бакториофагни или космидни експресионни вектори. Подходящи клетки гостоприемници, трансформирани с такива вектори, съдържащи потенциални aveC хомолог кодиращи последователности, могат след това да бъдат анализирани за AveC-тип активност, като се използват методи, като HPLC анализ на ферментационните продукти, както е описано, например в Раздел 7, по-долу.

Получаване и манипулации на полинуклеотидните молекули, представени тук, са във възможностите на специалиста в тази област и могат да бъдат проведени съгласно описаните рекомбинантни техники, например в 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; и Erlich (ed), 1992, PCR Technology, Oxford University Press, New York, всяка от тях е включена тук чрез цитат. Полинуклеотидни клонове, кодиращи AveC генни продукти или AveC хомолог генни продукти, могат да бъдат идентифицирани като се използва всеки метод, известен в тази област, включително, но неограничаващо методите представени в

Раздел 7, по-долу. Геномни ДНК библиотеки, могат да бъдат отбрани за *aveC* или *aveC* хомолог кодиращи последователности, като се използват техники, като методите представени в Benton and Davis, 1977, Science 196:180, за бактериофагни библиотеки и в Grunstein and Hogness, 1975, Proc.Natl.Acad.Sci.USA, 72:3961-3965, за плазмидни библиотеки. Полинуклеотидни молекули, притежаващи нуклеотидни последователности, известни че включват *aveC* ORF, както е представен, например в плазмид pSE186 (ATCC 209604) или в плазмид pSE119 (описан в Раздел 7, по-долу), могат да бъдат използвани като сонди в тези експерименти за подбор. Алтернативно, могат да бъдат синтезирани олигонуклеотидни сонди, които съответствуват на нуклеотидните последователности, произлизащи от частични или завършени аминокиселинни последователности на пречистения AveC хомолог генен продукт.

5.2. Рекомбинантни системи

5.2.1. Клониращи и експресионни вектори

Настоящото изобретение по-нататък предоставя рекомбинантни клониращи вектори и експресионни вектори, които са полезни при клониране или експресиране на полинуклеотидни молекули на настоящото изобретение, включващи например, *aveC* ORF от *S. avermitilis* или всеки *aveC* хомолог ORFs. В неограничаващо изпълнение, настоящото изобретение предоставя плазмид pSE 186 (ATCC 209604), който съдържа цялата ORF на *aveC* от *S. avermitilis*.

Цялото следващо описание отнасящо се до *aveC* ORF от *S. avermitilis*, или полинуклеотидна молекула, съдържаща *aveC* ORF от *S. avermitilis* или части от него, или *S. avermitilis* AveC генен продукт, също се отнася за *aveC* хомолози или AveC хомолог генни продукти, ако не е указано изрично или от контекста.

Разработени са множество различни вектори за специфична употреба при *Streptomyces*, включително фаги, висококопийни плазмиди, нискокопийни плазмиди и *E.coli-Streptomyces* векторисовалка, измежду другите и всеки от тях може да бъде използван за приложение в настоящото изобретение. Известен брой резистентни към лекарства гени, също са клонирани от *Streptomyces* и някои от тези гени са включени във вектори като селективни маркери. Представени са примери за съвременни вектори за употреба при *Streptomyces*, измежду други източници, в Hutchinson, 1980, Applied Biochem.Biotech. 16:169-190.

Рекомбинантни вектори на настоящото изобретение, по-специално експресионни вектори, предпочитано са конструирани, така, че кодиращата последователност за полинуклеотидната молекула на изобретението е оперативно свързана с един или повече регулаторни елементи, необходими за транскрипцията и трансляцията на кодиращата последователност за произвеждане на полипептид. Както тук е използван, терминът "регулаторен елемент" включва, но не се ограничава до нуклеотидни последователности, които кодират индуцируеми и не-индуцируеми промотори, енхенсери, оператори и други елементи, известни в тази област, които служат да движат и/или регулират експресията на полинуклеотид кодиращи последователности. Също, както тук е използвано, кодиращата последователност е в "оперативна връзка" с един или повече регулаторни елементи, където регулаторните елементи, ефективно регулират и правят възможно презаписването на кодиращата последователност или превеждането на нейните мРНК, или и двете.

Типични плазмидни вектори, които могат да бъдат инженерно манипулирани така че да съдържат полинуклеотидна молекула на настоящото изобретение, включват pCR-Blunt, pCR2.1

(Invitrogen), pGEM3Zf (Promega) и векторът совалка pWHM3 (Vara et al., 1989, J.Bact. 171:5872-5881), измежду много други.

Добре известни в тази област са методи за конструиране на рекомбинантни вектори, съдържащи определени кодиращи последователности в оперативна връзка с подходящи регулаторни елементи и те могат да бъдат използвани за приложение на настоящото изобретение. Тези методи включват *in vitro* рекомбинантни техники, синтетични техники и *in vivo* генетична рекомбинация. Виж, например техниките описани в Maniatis et al., 1989, по-горе; Ausubel et al., 1989, по-горе; Sambrook et al., 1989, по-горе; Innis et al., 1995, по-горе; и Erlich, 1992, по-горе.

Регулаторните елементи на тези вектори могат да варират по сила и специфичност. В зависимост от използваната система гостоприемник/вектор, могат да бъдат използвани всеки от известен брой подходящи транскрипционни и транслационни елементи. Неограничаващи примери за транскрипционни регулаторни области или промотори за бактерии, включват β -gal промотора, T7 промотора, TAC промотора, λ ляв и десен промотори, trp и lac промотори, trp-lac слети промотори и по-специално за *Streptomyces*, промоторите *ermE*, *melC* и *tipA* и т.н. В едно специфично изпълнение, описано в Раздел 11 по-долу, е създаден експресионен вектор, който съдържа *aveC* ORF, клониран в съседство със силния конститутивен *ermE* промотор от *Saccharopolyspora erythraea*. Векторът е трансформиран в *S. avermitilis* и последващ HPLC анализ на ферментационни продукти показва повишен титър на произведени авермектини, в сравнение с производството със същия щам, но който вместо това експресира дивия-тип *aveC* алел.

Слети белтъчни експресионни вектори могат да бъдат използвани да експресират един AveC генен продукт-слет (фузионен) белтък. Пречистеният слет белтък може да бъде

използуван за създаване на антисеруми срещу AveC генен продукт, за изучаване биохимичните свойства на AveC генния продукт, за генно инженерно създаване на AveC слети белтъци с различни биохимични активности или да помагат при идентификацията, или пречистване на експресирания AveC генен продукт. Възможни слет белтък експресионни вектори включват, но не се ограничават до вектори, съдържащи последователности, които кодират β -галактозидаза и *trpE* фузии (сливания), малтоза-свързващи белтъчни фузии, глутатион-S-трансфераза фузии и полихистидин фузии (области носители). В едно алтернативно изпълнение, AveC генен продукт или част от него, може да бъде слет с AveC хомолог генен продукт, или част от него, произхождащ от други видове или щам на *Streptomyces*, като например, *S. hygroscopicus* или *S. griseochromogenes*. В едно специално изпълнение, описано в Раздел 12, по-долу, и представено във ФИГУРА 7, е конструиран химерен плазмид, който съдържа една 564 bp област от *S. hygroscopicus* *aveC* хомолог ORF, чрез заместване на една хомоложна 564bp област от *S. avermitilis* *aveC* ORF. Такива хибридни вектори могат да бъдат трансформирани в клетки на *S. avermitilis* и тествани за определяне техния ефект, например върху отношението на клас 2:1 произведен авермектин.

AveC слети белтъци могат да бъдат генно инженерно манипулирани да съдържат област полезна за пречистване. Например, AveC-малтоза-свързващ белтък фузии могат да бъдат пречистени като се използва амилозна смола; AveC-глутатион-S-трансфераза слети (фузионни) белтъци могат да бъдат пречистени използвайки глутатион-агароза bead зърна; AveC-полихистидин фузиите могат да бъдат пречистени като се използва двувалентна никелова смола. Алтернативно, антитела срещу белтък носител или пептид, могат да бъдат използвани за пречистване на слет белтък с

афинитетна хроматография. Например, нуклеотидна последователност кодираща прицелен епитоп на моноклонално антитяло, може да бъде генно инженерно манипулирана в експресионния вектор в оперативна връзка с регулаторни елементи и разположена така, че експресираният епитоп да е слет с AveC полипептид. Например, нуклеотидна последователност, кодираща FLAGTM епитоп tag (International Biotechnologies Inc.), който е хидрофилен маркерен пептид, може да бъде включена чрез инсерция със стандартни техники, в експресионния вектор на място съответстващо, например на карбоксилния край на AveC полипептида. Експресираният AveC полипептид-FLAGTM епитоп фузионен продукт, може да бъде открит и афинитетно пречистен, използвайки анти-FLAGTM антитела, които са търговски достъпни.

Експресионният вектор, кодиращ AveC слетия белтък, може също генно инженерно да бъде манипулиран, да съдържа полилинкерни последователности, които кодират специфични места за протеазно срязване, така че експресираният AveC полипептид може да бъде освободен от областта носител или фузионния участник, чрез третиране със специфична протеаза. Например, слетият белтъчен вектор може да включва ДНК последователности, кодиращи тромбин или фактор Ха места на срязване, измежду другите.

Една сигнална последователност пред и в рамката за четене с aveC ORF, може да бъде инженерно манипулирана в експресионния вектор, с познати методи да насочи придвижването и секрецията на експресирания генен продукт. Не-ограничаващи примери за сигнални последователности, включват такива от α фактор, имуноглобулини, белтъци на външната мембрана, пеницилаза и Т-клетъчни рецептори, измежду други.

За да помогне при отбора на клетки гостоприемници, трансформирани или трансфектирани с клониращи или експресионни вектори на настоящото изобретение, векторът може инженерно да бъде манипулиран, по-нататък да включва кодираща последователност за репортерен генен продукт или друг подбран маркер. Такава кодираща последователност предпочитано е в оперативна връзка с регулаторния елемент, кодиращ последователности, както е описано по-горе. Репортерни гени, които са полезни за изобретението, са добре известни в тази област и включват такива, които кодират зелен флуоресцентен белтък, луцифераза, хуЕ и тирозиназа. Нуклеотидни последователности, кодиращи подбрани маркери, са добре известни в тази област и включват тези, които кодират генни продукти, придаващи резистентност към антибиотици или антиметаболити, или които придават ауксотрофно изискване. Примери за такива последователности включват такива, които кодират резистентност към еритромицин, тиострептон или канамицин, измежду много други.

5.2.2. Трансформиране на клетки гостоприемници

Настоящото изобретение по-нататък предоставя трансформирани клетки гостоприемници, съдържащи полинуклеотидна молекула или рекомбинантен вектор на изобретението и нови щамове или клетъчни линии произхождащи от тях. Клетки гостоприемници полезни за практиката на изобретението, предпочитано са *Streptomyces* клетки, въпреки че могат да бъдат използвани и други прокариотни клетки или еукариотни клетки. Такива трансформирани клетки гостоприемници, обикновено включват, но не се ограничават до микроорганизми, като бактерии трансформирани с рекомбинантна бактериофагна ДНК, плазмидни ДНК или космидни ДНК вектори, или дрожди трансформирани с рекомбинантни вектори, измежду други.

Полинуклеотидните молекули на настоящото изобретение са предвидени да функционират в клетки от *Streptomyces*, но могат също да бъдат трансформирани в други бактериални или еукариотни клетки, например за целите на клониране или експресия. Обикновено може да бъде използван един щам *E.coli* като например, DH5 α щама, на разположение от American Type Culture Collection (ATCC), Rockville, MD, USA (Accession No. 31343) и от търговски източници (Stratagene). Предпочитани еукариотни клетки гостоприемници включват дрождени клетки, въпреки че могат също ефективно да бъдат използвани клетки от бозайници или насекоми.

Рекомбинантният експресионен вектор на изобретението, предпочитано е трансформиран или трансфектиран в една или повече клетки гостоприемници от по същество хомогенна клетъчна култура. Експресионният вектор общо е въведен в клетки гостоприемници, в съответствие с известни техники, като например чрез протопластна трансформация, утаяване скалциев фосфат, третиране с калциев хлорид, микроинжектиране, електропорация, трансфекция чрез контакт с рекомбиниран вирус, липозомно-медирана трансфекция, DEAE-декстран трансфекция, трансдукция, конюгация или микропрожектилно бомбардиране. Може да бъде направен отбор на трансформанти със стандартни процедури, като чрез отбор за клетки експресиращи подбран маркер, например, резистентност към антибиотик, свързан с рекомбинантният вектор, както е описано по-горе.

Веднаж въведен експресионният вектор в клетката гостоприемник, интеграцията и подържането на *aveC* кодиращата последователност в хромозома на клетката гостоприемник или епизомно, могат да бъдат потвърдени със стандартни техники, например със Southern хибридизационен анализ, рестрикционен ензимен анализ, PCR анализ, включително обратна транскриптаза

(reverse transcriptase) PCR (rt-PCR) или с имунологичен тест, за откриване на очакван генен продукт. Клетки гостоприемници съдържащи и/или експресиращи рекомбинантната *aveC* кодираща последователност, могат да бъдат идентифицирани с най-малко четири общи подхода, които са добре известни в тази област, включващи: (i) ДНК-ДНК, ДНК-РНК или РНК-антисенз РНК хибридизация; (ii) откриване наличието на "маркерни" генни функции; (iii) определяне нивото на транскрипция, измерено чрез експресията на *aveC*-специфични мРНК транскрипти в клетката гостоприемник; и (iv) откриване наличието на зрял полипептиден продукт, измерен например, чрез имуно тест или по наличието на AveC биологична активност (например, произвеждането на специфични отношения и количества авермектини, показателни за AveC активност в например, *S. avermitilis* клетки гостоприемници).

5.2.3. Експресия и характеризиране на на рекомбинантен AveC генен продукт

Веднаж стабилно въведена *aveC* кодиращата последователност в подходяща клетка гостоприемник, трансформираната клетка гостоприемник клонално е размножена и получените клетки могат да бъдат култивирани в условия, водещи до максимално производство на AveC генен продукт. Такива условия обикновено включват клетки растящи до висока плътност. Когато експресионният вектор съдържа индуцируем промотор, подходящи индукционни условия като например температурна промяна, изчерпване на хранителни източници, добавка на неподходящи индуктори (например, аналози на въглехидрати, като изопропил- β -D-тиогалактопиранозид (IPTG)), натрупване излишек от метаболитни странични продукти или подобни, са използвани като необходими да индуцират експресия.

Там където експресираният AveC генен продукт е задържан вътре в клетките гостоприемници, клетките са събирани и лизирани и изолираният продукт е пречистен от лизата при условия на екстракция, известни в тази област, за намаляване белтъчната деградация, като например при 4°C или в присъствието на протеазни инхибитори, или и двете. Там където експресираният AveC генен продукт е секретиран от клетките гостоприемници, изтощената хранителна среда може просто да бъде събрана и продуктът да бъде изолиран от нея.

Експресираният AveC генен продукт може да бъде изолиран или съществено пречистен от клетъчни лизати или среда за култивиране, както е подходящо, като се използват стандартни методи, включително, но не ограничено, като всяка комбинация от следните методи: утаяване с амониев сулфат, фракциониране в зависимост от големината, йонообменна хроматография, HPLC, плътностно центрофугиране и афинитетна хроматография. Там където експресираният AveC генен продукт проявява биологична активност, повишена чистота на препаата може да бъде контролирана на всеки етап от процедурата на пречистване, като се прилагат съответни тестове. Дали проявява или не проявява биологична активност експресираният AveC генен продукт, може да бъде открито въз основа например на големина, реактивност с антитяло, което от друга страна е специфично за AveC, или по наличието на фузионен tag. Както тук е използвано, AveC генен продукт е "съществено пречистен", когато продуктът съставлява повече от около 20% тегловни от белтъка в дадения препарат. Също, както тук е използвано, AveC генен продукт е "изолиран" когато продуктът съставлява най-малко от около 80% тегловни от белтъка в даден препарат.

05.03.02

Така настоящото изобретение предоставя рекомбинантно-експресиран изолиран или съществено пречистен *S. avermitilis* AveC генен продукт, включващ аминокиселинната последователност, кодирана от AveC генен продукт-кодиращата последователност на плазмид pSE186 (ATCC 209604), или аминокиселинната последователност от ФИГУРА 1 (SEQ ID NO:2), или съществена част от нея и техни хомолози.

По-нататък настоящото изобретение предоставя рекомбинантно-експресиран, изолиран или съществено пречистен *S. hygroscopicus* AveC хомолог генен продукт, включващ аминокиселинната последователност на SEQ ID NO:4 или съществена част от нея и нейни хомолози.

По-нататък настоящото изобретение предоставя метод за получаване на AveC генен продукт, характеризиращ се с това, че се култивира клетка гостоприемник, трансформирана с рекомбинантен експресионен вектор, споменатият вектор съдържащ полинуклеотидна молекула, притежаваща нуклеотидна последователност, кодираща AveC генен продукт, която полинуклеотидна молекула е оперативно свързана с един или повече регулаторни елементи, които контролират експресия на полинуклеотидната молекула в клетката гостоприемник, в условия водещи до получаване на рекомбинантния AveC генен продукт и добиване на AveC генния продукт от клетъчната култура.

Рекомбинантно експресираният *S. avermitilis* AveC генен продукт е полезен за различни цели, включително за отбор на съединения, които променят функцията на AveC генен продукт и при това модулират биосинтезата на авермектин, и за създаване на антитела, насочени срещу AveC генния продукт.

Веднаж получен AveC генен продукт със задоволителна чистота, може да бъде характеризиран със стандартни методи,

включващи SDS-PAGE, гелово проникваща хроматография, анализ на аминокиселинна последователност, биологична активност при получаване на съответни продукти на авермектин биосинтетичния път и т.н. Например, аминокиселинната последователност на AveC генен продукт може да бъде определена като се използват стандартни пептидни техники на секвениране. По-нататък AveC генният може да бъде характеризиран като се използва анализ за хидрофилност (виж например, Hopp and Woods, 1981, Proc.Natl.Acad.Sci.USA 78:3824) или аналогови програмни алгоритми, за идентифициране хидрофобни и хидрофилни области на AveC генен продукт. Може да бъде проведен структурен анализ за идентифициране области от AveC генния продукт, които приемат специфични вторични структури. Биофизични методи като X-лъчева кристалография (Engstrom, 1974, Biochem.Exp.Biol. 11: 7-13), компютерно моделиране (Fletterick and Zoller (eds), 1986, в: Current Communications in Molecular Biology, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harboor, NY), и ядрен магнитен резонанс (NMR) могат да бъдат използвани за картиране и изучаване местата на взаимодействие между AveC генен продукт и неговия субстрат. Информация получена от тези проучвания може да бъде използвана за подбор на нови места за мутация в aveC ORF, която да помогне за развитие на нови щамове на *S. avermitilis*, притежаващи по-желани характеристики за производството на авермектин.

5.3. Конструирание и употреба на AveC мутанти

Настоящото изобретение предоставя полинуклеотидна молекула, съдържаща нуклеотидна последователност, която от друга страна е същата като *S. avermitilis* aveC алела, или негов дегенериран вариант, или AveC генен продукт-кодиращата последователност от плазмид pSE 186 (ATCC 209604), или негов дегенериран вариант, или

нуклеотидната последователност от *aveC* ORF от *S. avermitilis* както е представено на ФИГУРА 1 (SEQ ID NO:1), или негов дегенериран вариант, но който по-нататък включва една или повече мутации, така че тези клетки на *S. avermitilis* щам ATCC 53692, в който дивия-тип *aveC* алел е инактивиран и който експресира полинуклеотидната молекула, съдържаща мутантната нуклеотидна последователност или нейн дегенериран вариант, произвежда различно отношение или количество авермектини, които са произведени от клетки на *S. avermitilis* щам ATCC 53692, който вместо това експресира само дивия-тип *aveC* алел.

Съгласно настоящото изобретение, такива полинуклеотидни молекули могат да бъдат използвани за получаване на нови щамове на *S. avermitilis*, които проявяват откриваема промяна в произвеждането на авермекти, в сравнение със същия щам, който вместо това експресира само дивия-тип *aveC* алел. В предпочитано изпълнение, такива полинуклеотидни молекули са полезни за създаване на нови щамове на *S. avermitilis*, които произвеждат авермектини в редуциран клас 2:1 отношение, в сравнение със същия щам, който вместо това експресира само дивия-тип *aveC* алел. В следващо предпочитано изпълнение, такива полинуклеотидни молекули са полезни за получаване на нови щамове от *S. avermitilis*, които произвеждат повишени нива авермектини, сравнени със същия щам, който вместо това експресира само дивия-тип *aveC* алел. В следващо предпочитано изпълнение, такива полинуклеотидни молекули са полезни за получаване на нови щамове от *S. avermitilis*, в които *aveC* генът е инактивиран.

Мутации на *aveC* алела или кодиращата последователност, включват всякакви мутации, които въвеждат една или повече делеции, добавяния или замени в *AveC* генния продукт, или които водят до скъсяване на *AveC* генния продукт, или която и да е негова

комбинация и това води до желания резултат. Такива мутантни *aveC* алелни последователности също са предвидени да включват всякакви техни дегенерирани варианти. Например, настоящото изобретение предоставя полинуклеотидни молекули, съдържащи нуклеотидната последователност на *aveC* алела, или негов дегенериран вариант, или *AveC* генен продукт-кодиращата последователност на плазмид pSE 186 (ATCC 209604), или неин дегенериран вариант, или нуклеотидната последователност на *aveC* ORF от *S. avermitilis* както е представено във ФИГУРА 1 (SEQ ID NO:1) или неин дегенериран вариант, но която по-нататък съдържа една или повече мутации, която кодира замяната на един аминокиселинен остатък с друг аминокиселинен остатък в избрана позиция в *AveC* генния продукт. В някои не-ограничаващи изпълнения, някои от които са дадени за пример по-долу, такива замени могат да бъдат направени в аминокиселинни позиции на *AveC* генния продукт, които съответствуват на аминокиселинните позиции 38, 48, 55, 89, 99, 111, 136, 139, 154, 179, 228, 230, 238, 266, 275, 289 или 298 от SEQ ID NO:2 или някои негови комбинации.

Мутации на *aveC* кодиращата последователност са изпълнени с който и да е от разнообразието известни методи, включително с прилагане на податлива на грешки PCR или с касетъчна мутагенеза. Например, олигонуклеотид-насочена мутагенеза може да се приложи за промяна последователността от *aveC* алела или ORF по определен начин, като например, за въвеждане на едно или повече рестрикционни места, или завършващ кодон, в специфични области в рамките на *aveC* алела или ORF. Методи като тези описани в U.S. Patent 5,605,793, U.S. Patent 5,830,721 и U.S. Patent 5,837,458, които включват случайно фрагментиране, повторни цикли на мутагенеза и нуклеотидно усукване (shuffling), могат също да бъдат използвани за създаване

на големи библиотеки от полинуклеотиди, притежаващи нуклеотидни последователности, кодиращи *aveC* мутации.

Прицелни мутации могат да бъдат полезни, по-специално там където те служат да променят един или повече консервирани аминокиселинни остатъци в *AveC* генния продукт. Например, сравнението на производни аминокиселинни последователности на *AveC* генни продукти и *AveC* хомолог генни продукти от *S. avermitilis* (SEQ ID NO:2), *S. griseochromogenes* (SEQ ID NO:5) и *S. hygrosopicus* (SEQ ID NO:4), както са представени във фигура 6, показва места на значимо консервиране на аминокиселинни остатъци между тези видове. Прицелна мутагенеза, която води до промяна в един или повече от тези консервирани аминокиселинни остатъци, може да бъде особено ефективна при получаване на нови мутантни щамове, които проявяват желани промени в производството на авермектин.

Случайна мутагенеза може също да бъде полезна и може да бъде изпълнена, като клетки на *S. avermitilis* се подложат на ултравиолетово олъчване или X-лъчи, или химични мутагени като N-метил-N'-нитрозогуанидин, етил метан сулфонат, азотиста киселина или nitrogen mustards. Виж, например Ausubel, 1989, по-горе за обзор на техники за мутагенеза.

Веднъж създадени мутантни полинуклеотидни молекули, те са отбрани за определяне дали те могат да модулират биосинтезата на авермектин в *S. avermitilis*. В предпочитано изпълнение, полинуклеотидна молекула притежаваща мутантна нуклеотидна последователност се тестира чрез комплементиране с един щам от *S. avermitilis*, в който *aveC* генът е инактивиран за получаване *aveC* отрицателна (*aveC*⁻) среда. В един не-ограничаващ метод, мутантната полинуклеотидна молекула е снабдена в експресионен плазмид в оперативна връзка с един или повече регулаторни елементи, който плазмид предпочитано съдържа един или повече

резистентни към лекарства гени, което да позволи подбор на трансформирани клетки. Този вектор след това е трансформиран в *aveC*-клетки гостоприемници, като са използвани известни техники, и трансформирани клетки са отбрани и култивирани в подходящи ферментационни среди, в условия разрешаващи или индуциращи производство на авермектин. След това ферментационните продукти са анализирани с HPLC за определяне способността на мутантната полинуклеотидна молекула да комплементира клетката гостоприемник. В Раздел 8.3 по-долу, са дадени за пример няколко вектори, носещи мутантни полинуклеотидни молекули, способни да редуцират B2:B1 отношението на авермектини, включително pSE188, pSE199, pSE231, pSE239 и pSE290 до pSE297.

Настоящото изобретение предоставя методи за идентифициране мутации на *S. avermitilis* *aveC* ORF, способни да променят отношението и/или количеството произведени авермектини. В предпочитано изпълнение, настоящото изобретение предоставя метод за идентифициране мутации на *aveC* ORF, способни да променят клас 2:1 отношението произведени авермектини, характеризиращ се с това, че: (а) се определя клас 2:1 отношението авермектини произведени от клетки на един щам *S. avermitilis*, в който *aveC* алелът присъщ на него, е инактивиран и в който една полинуклеотидна молекула, съдържаща нуклеотидна последователност, кодираща мутантен *AveC* генен продукт, е включена и е експресирана; (b) се определя клас 2:1 отношението авермектини произведени от клетки на същия щам *S. avermitilis* както в етап (а), но който вместо това експресиращ само дивия-тип *aveC* алел или един *aveC* алел, притежаващ нуклеотидната последователност на ORF от ФИГУРА 1 (SEQ ID NO:1), или нуклеотидна последователност, която е хомоложна на нея; и (с) се сравнява клас 2:1 отношението на авермектини произведени от *S. avermitilis* клетки от етап (а) с клас 2:1

отношението на авермектини произведени от *S. avermitilis* клетки от етап (b); така че ако клас 2:1 отношението авермектини произведени с *S. avermitilis* клетки от етап (a) е различно от клас 2:1 отношението авермектини произведени от *S. avermitilis* клетки от етап (b), тогава е идентифицирана мутация на *aveC* ORF, способна да променя клас 2:1 отношението на авермектини. В предпочитано изпълнение, клас 2:1 отношението на авермектини е намалено чрез мутацията.

В следващо предпочитано изпълнение, настоящото изобретение предоставя метод за идентифициране мутации на *aveC* ORF или генетични конструкции съдържащи *aveC* ORF, способен да променя количеството произведени авермектини, характеризиращ се с това, че: (a) се определя количеството авермектини произведени от клетки на един щам *S. avermitilis*, в който присъщия му *aveC* алел е инактивиран и в който една полинуклеотидна молекула, съдържаща нуклеотидна последователност, кодираща мутантен *AveC* генен продукт, или съдържащ генетичен конструкт, включващ нуклеотидна последователност, кодираща *AveC* генен продукт, е въведена и се експресира; (b) се определя количеството авермектини произведени от клетки на същия щам *S. avermitilis* както в етап (a), но който вместо това експресира само див-тип *aveC* алел или нуклеотидна последователност, която е хомоложна на него; и (c) се сравнява количеството авермектини произведени от *S. avermitilis* клетки на етап (a) с количеството авермектини произведени от *S. avermitilis* клетки на етап (b); така че ако количеството произведени авермектини от *S. avermitilis* клетки на етап (a) е различно от количеството авермектини произведени от *S. avermitilis* клетки на етап (b), тогава е идентифицирана мутация на *aveC* ORF или генетичен конструкт, способен да променя количеството авермектини. В едно предпочитано изпълнение, количеството произведени авермектини е нараснало чрез мутацията.

Всеки от гореспоменатите методи за идентифициране на мутации, може да бъде изпълнен като се използват ферментационни среди за култивиране, предпочитано допълнени с циклохексан карбоксиллова киселина, въпреки че могат също да бъдат използвани други подходящи предшественици на мастни киселини, като всеки от предшествениците на мастни киселини изброени в ТАБЛИЦА 1.

След като е идентифицирана мутантна полинуклеотидна молекула, която модулира производството на авермектин в желана посока, може да бъде определена локализацията на мутацията в нуклеотидната последователност. Например, полинуклеотидна молекула, притежаваща нуклеотидна последователност, кодираща мутантен AveC генен продукт, може да бъде изолирана с PCR и подложена на ДНК секвениращ анализ, като се използват известни методи. Сравнявайки ДНК последователността на мутантния aveC алел, с тази на дивия-тип aveC алел, може да бъде определена мутацията(и) отговорна за промяната производството на авермектин. В специфични, но не-ограничаващи изпълнения на настоящото изобретение, *S. avermitilis* AveC генни продукти, съдържащи единични аминокиселинни замени при всеки от остатъци 55(S55F), 138 (S138T), 139 (A139T) или 230 (G230D) или двойни замени в позиции 138 (S138T) и 139 (A139T или A139F), предизвикват промени във функцията на AveC генен продукт, така че отношението на клас 2:1 произведени авермектини, е променено (виж Раздел 8, по-долу), където изброените аминокиселинни позиции съответствуват на тези представени във ФИГУРА 1 (SEQ ID NO:2). В допълнение е показано за всяка от следните седем комбинации на мутации, че редуцира ефективно клас 2:1 отношението на авермектини: (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/Q289H. Както тук е използвано, гореспоменатите

обозначения, като A139T, показват, че оригиналният аминокиселинен остатък с единично буквено обозначение, което в този пример е аланин (A), в указаната позиция, която в този пример е позиция 139 (отнасяща се до SEQ ID NO:2) на полипептида, последван от аминокиселинния остатък, който заменя оригиналния аминокиселинен остатък, който в този пример е треонин (T). Съответно, полинуклеотидни молекули, притежаващи нуклеотидни последователности, които кодират мутантни *S. avermitilis* AveC генни продукти, включващи аминокиселинни замени или делеции в една или повече аминокиселинни позиции 38, 48, 55, 89, 99, 111, 136, 138, 139, 154, 179, 228, 230, 238, 266, 275, 289 или 298 (виж ФИГУРА 1), или всяка тяхна комбинация, са обхванати от настоящото изобретение.

В предпочитано изпълнение, такива мутации кодират аминокиселинни замени, подбрани една или повече от група, състояща се от:

- (a) аминокиселинен остатък Q в позиция 38, заменен с P или с аминокиселина, която е една консервативна замяна за P;
- (b) аминокиселинен остатък D в позиция 48, заменен с E или с аминокиселина, която е една консервативна замяна за E;
- (c) аминокиселинен остатък A в позиция 89, заменен с T или с аминокиселина, която е една консервативна замяна за T;
- (d) аминокиселинен остатък F в позиция 99, заменен със S или с аминокиселина, която е една консервативна замяна за S;
- (e) аминокиселинен остатък G в позиция 111, заменен с V или с аминокиселина, която е една консервативна замяна за V;

- (f) аминокиселинен остатък L в позиция 136, заменен с P или с аминокиселина, която е една консервативна замяна за P;
- (g) аминокиселинен остатък S в позиция 138, заменен с T или с аминокиселина, която е една консервативна замяна за T;
- (h) аминокиселинен остатък A в позиция 139, заменен с T или F, или с аминокиселина, която е една консервативна замяна за T или F;
- (i) аминокиселинен остатък K в позиция 154, заменен с E или с аминокиселина, която е една консервативна замяна за E;
- (j) аминокиселинен остатък G в позиция 179, заменен със S или с аминокиселина, която е една консервативна замяна за S;
- (k) аминокиселинен остатък M в позиция 228, заменен с T или с аминокиселина, която е една консервативна замяна за T;
- (l) аминокиселинен остатък E в позиция 238, заменен с D или с аминокиселина, която е една консервативна замяна за D;
- (m) аминокиселинен остатък P в позиция 289, заменен с L или с аминокиселина, което е една консервативна замяна за L; и
- (n) аминокиселинен остатък Q в позиция 298, заменен с H или с аминокиселина, която е една консервативна замяна за H;

където консервативните аминокиселинни замени са както е определено в Раздел 5.1.

В следващо предпочитано изпълнение, такива мутации кодират комбинация от аминокиселинни замени, където комбинацията от заменени аминокиселинни остатъци е подбрана от група, състояща се от:

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

В следващо предпочитано изпълнение, специфични комбинации от мутации в *aveC* алела, полезни за ефективно редуциране на клас 2:1 отношението на авермектини, съгласно настоящото изобретение, са подбрани от една или повече от групата състояща се от:

- (a) S138T/A139T
- (b) S138T/A139F
- (c) D48E/A89T;
- (d) S138T/A139T/G179S;
- (e) Q38P/L136P/E238D;
- (f) F99S/S138T/A139T/G179S;
- (g) A139T/M228T;
- (h) G111V/P289L; и
- (i) A139T/K154E/Q298H.

Настоящото изобретение по-нататък предоставя препарати за получаване нови щамове *S. avermitilis*, клетките на които съдържат мутантен *aveC* алел, което води до промени в производството на авермектин. Например, настоящото изобретение предоставя

рекомбинантни вектори, които могат да бъдат използвани да прицелват всяка от полинуклеотидните молекули, съдържащи мутантни нуклеотидни последователности на настоящото изобретение, към мястото на *aveC* гена на *S. avermitilis* хромозомата, за да вмъкнат във или да заменят *aveC* ORF или част от него, чрез хомоложна рекомбинация. Съгласно настоящото изобретение, обаче, полинуклеотидна молекула, съдържаща мутантна нуклеотидна последователност на настоящото изобретение предоставена тук, може също да функционира като модулира биосинтезата на авермектин, когато е включена в хромозомата на *S. avermitilis* на място, различно от това на *aveC* гена, или когато е подържана епизомно в клетки на *S. avermitilis*. Така, настоящото изобретение предоставя също вектори, съдържащи полинуклеотидна молекула, включваща мутантна нуклеотидна последователност на настоящото изобретение, които вектори могат да бъдат използвани да вмъкнат полинуклеотидната молекула на място в хромозомата на *S. avermitilis*, което е различно от това на *aveC* гена, или да бъде подържана епизомно.

В едно предпочитано изпълнение, настоящото изобретение предоставя ген заменящи вектори, които могат да бъдат използвани да вмъкнат чрез инсерция мутантен *aveC* алел или дегенериран негов вариант в клетки на щам от *S. avermitilis*, при което се създават нови щамове *S. avermitilis*, клетките на които произвеждат авермектини в променен клас 2:1 отношение, в сравнение с клетки на същия щам, който вместо това експресира само дивия-тип *aveC* алел. В предпочитано изпълнение, клас 2:1 отношението произведени авермектини от клетките е редуцирано. Могат да бъдат конструирани такива ген заместващи вектори, като се използват мутантни полинуклеотидни молекули, присъстващи в експресионни вектори,

предоставени тук, като например, pSE188, pSE199 и pSE231, които експресионни вектори са дадени за примери в Раздел 8, по-долу.

В следващо предпочитано изпълнение, настоящото изобретение предоставя вектори, които могат да бъдат използвани да въведат чрез инсерция мутантен *aveC* алел или негов дегенериран вариант, в клетки на щам от *S. avermitilis*, за създаване на нови щамове клетки, които произвеждат променени количества авермектини, в сравнение с клетки от същия щам, които вместо това експресират само дивия-тип *aveC* алел. В предпочитано изпълнение, количеството авермектини произведени от клетките е повишено. В специфично, но не-ограничаващо изпълнение, такъв вектор по-нататък включва силен промотор, какъвто е известен на специалистите в тази област, като например, силният конститутивен *ermE* промотор от *Saccharopolyspora erythraea*, който е разположен преди и в оперативна връзка с *aveC* алела. Такъв вектор може да бъде плазмид pSE189, описан в Пример 11, по-долу, или може да бъде конструиран, като се използва мутантния *aveC* алел от плазмид pSE189.

В следващо предпочитано изпълнение, настоящото изобретение предоставя ген заместващи вектори, които са полезни за инактивиране *aveC* гена в дивия-тип щам *S. avermitilis*. В едно не-ограничаващо изпълнение, такива ген заместващи вектори, могат да бъдат конструирани като се използва мутантна полинуклеотидна молекула, присъстваща в плазмид pSE180 (ATCC 209604), която е дадена за пример в Раздел 8.1, по-долу (ФИГУРА 3). Настоящото изобретение по-нататък предоставя ген заместващи вектори, които съдържат полинуклеотидна молекула, включваща или състояща се от нуклеотидни последователности, които по природа ограничават *aveC* гена *in situ* в *S. avermitilis* хромозомата, включвайки например, онези ограничаващи нуклеотидни последователности, които са представени

във ФИГУРА 1 (SEQ ID NO:1), които вектори могат да бъдат използвани да делетират *S. avermitilis* aveC ORF.

По-нататък настоящото изобретение предоставя методи за получаване на нови щамове *S. avermitilis*, характеризиращи се с това, че клетки, които експресират мутантни aveC алели, произвеждат променено отношение и/или количество авермектини, в сравнение с клетки от същия щам *S. avermitilis*, който вместо това експресира само дивия-тип aveC алел. В предпочитано изпълнение, настоящото изобретение предоставя метод за получаване нови щамове *S. avermitilis*, характеризиращ се с това, че клетки, които експресират мутантен aveC алел и които произвеждат променено клас 2:1 отношение авермектини, сравнени с клетки от същия щам *S. avermitilis*, който вместо това експресира само дивия-тип aveC алел, включващ трансформиращи клетки от щам на *S. avermitilis* с вектор, който носи мутантен aveC алел, кодиращ генен продукт, който променя клас 2:1 отношението на авермектини получени от клетки на щам *S. avermitilis*, експресиращи мутантния aveC алел, сравнени с клетки от същия щам, които вместо това експресират само дивия-тип aveC алел и подбирайки трансформирани клетки, които произвеждат авермектини в едно променено клас 2:1 отношение, сравнени с клас 2:1 отношението, произведено от клетки на същия щам, който вместо това експресира само дивия-тип aveC алел. В по-предпочитано изпълнение, настоящото изобретение предоставя метод за получаване на нов щам *S. avermitilis*, характеризиращ се с това, че се трансформират клетки от един щам на *S. avermitilis* с вектор, способен да въвежда мутация в aveC алела на такива клетки, където мутацията на aveC алела води до заместване в кодирания AveC генен продукт на различен аминокиселинен остатък, в една или повече аминокиселинни позиции, съответстващи на аминокиселинните остатъци 38, 48, 55, 89, 99, 111, 136, 138, 139, 154,

179, 228, 230, 238, 266, 275, 289 или 298 на SEQ ID NO:2, така че клетки на *S. avermitilis* щам, в които *aveC* алелът е мутиран така, че да произвежда клас 2:1 отношение авермектини, което е различно от отношението, получено от клетки на същия *S. avermitilis* щам, който вместо това експресира само дивия-тип *aveC* алел. В предпочитано изпълнение, промененото клас 2:1 отношение на авермектини е редуцирано.

Както тук е използвано, когато аминокиселинен остатък, кодиран от един *aveC* алел в *S. avermitilis* хромозомата, или във вектор, или изолирана полинуклеотидна молекула на настоящото изобретение, се определя като "съответстващ на" даден аминокиселинен остатък от SEQ ID NO:2 или където една аминокиселинна замяна се определя като появяваща се в дадена позиция "съответстваща на" специфично номериран аминокиселинен остатък от SEQ ID NP:2, това е предвидено да се отнася за аминокиселинен остатък в същото относително местонахождение в AveC генния продукт, който специалистът в тази област, може бързо да определи по отношение на аминокиселината последователност, представена тук като SEQ ID NO:2.

Настоящото изобретение по-нататък предоставя методи за получаване на нови щамове, където специфични мутации в *aveC* алела, кодиращ определени мутации, са изброени като базови промени в специфични нуклеотидни позиции в *aveC* алела, "съответстващи на" определени нуклеотидни позиции, както е показано в SEQ ID NO:1. Както по-горе, с оглед съответстващи аминокиселинни позиции, където нуклеотидната позиция в *aveC* алела е определена като "съответстваща на" дадена нуклеотидна позиция в SEQ ID NO:1, е предвидено да се отнася за нуклеотид в същата относителна локализация в *aveC* нуклеотидната последователност, която специалистът в дадената област може

бързо да определи, по отношение на нуклеотидната последователност, представена тук като SEQ ID NO:1.

В следващо предпочитано изпълнение, настоящото изобретение предоставя метод за получаване на нови щамове *S. avermitilis*, характеризиращ се с това, че клетки, които произвеждат променени количества авермектин, включващ трансформиращи клетки от един щам на *S. avermitilis*, с вектор, който носи мутантен *aveC* алел или генетичен конструкт, съдържащ *aveC* алела, експресията, на който води до промяна на количеството произведени авермектини от клетки на един щам *S. avermitilis*, експресиращи мутантния *aveC* алел или генетичен конструкт, сравнени с клетки на същия щам, които вместо това експресират само единичен див-тип *aveC* алел, и подбор на трансформирани клетки, които произвеждат авермектини в променено количество, сравнени с количеството произведени авермектини от клетки на щама, които вместо това експресират само единствения див-тип *aveC* алел. В едно предпочитано изпълнение, количеството произведени авермектини в трансформираните клетки е повишено.

В следващо предпочитано изпълнение, настоящото изобретение предоставя метод за получаване на нови щамове *S. avermitilis*, клетките на които включват един инактивиран *aveC* алел, включващ трансформиращи клетки на един щам *S. avermitilis*, които експресират всеки *aveC* алел с вектор, който инактивира *aveC* алела и подбор на трансформирани клетки, в които *aveC* алелът е инактивиран. В предпочитано, но не-ограничаващо изпълнение, клетки от един щам *S. avermitilis* са трансформирани с ген заменящ вектор, който носи *aveC* алел, който е инактивиран чрез мутация или чрез замяна на част от *aveC* алела с хетероложна генна последователност, и са отбрани трансформирани клетки, в които *aveC* алелът, който е присъщ на нея, е заменен с инактивиран *aveC*



алел. Инактивиране на *aveC* алел може да бъде определено с HPLC анализ на ферментационни продукти, както е описано по-долу. В специфично, но не-ограничаващо изпълнение, описано в Раздел 8.1 по-долу, *aveC* алелът е инактивиран чрез инсерция на *ermE* ген от *Saccharopolyspora erythraea* в *aveC* ORF.

По-нататък, настоящото изобретение предоставя нови щамове *S. avermitilis*, включващи клетки, които са трансформирани с всяка от полинуклеотидните молекули или вектори на настоящото изобретение. В предпочитано изпълнение, настоящото изобретение предоставя нови щамове *S. avermitilis*, включващи клетки, които експресират мутантен *aveC* алел или негов дегенириран вариант, на мястото на, или в допълнение на, дивия-тип *aveC* алел, където клетките на новия щам произвеждат авермектини в едино променено клас 2:1 отношение, сравнени с клас 2:1 отношението на авермектини произведени от клетки на същия щам, които вместо това експресират само дивия-тип *aveC* алел. В предпочитано изпълнение, промененото клас 2:1 отношение, произведено от новите клетки е редуцирано. Такива нови щамове са полезни при производство в голям мащаб на търговски желани авермектини като дорамектин. В по-предпочитано изпълнение, настоящото изобретение предоставя клетки на *S. avermitilis*, включващи всяка от горепосочените мутации или комбинации от мутации в *aveC* алела в нуклеотидни позиции, съответстващи на тези, представени тук по-горе или които от друга страна кодират всяка от горепосочените аминокиселинни замествания в *AveC* генния продукт. Въпреки че такива мутации могат да присъствуват в такива клетки върху един екстрахромозомен елемент, като един плазмид, предпочита се такива мутации да присъствуват в *aveC* алела, локализиран в хромозомата на *S. avermitilis*. В предпочитано изпълнение, настоящото изобретение предоставя един щам *S. avermitilis*, включващ клетки с мутация в *aveC*

алела, който кодира AveC генен продукт, притежаващ замяна в една или повече аминнокиселинни позиции, съответстващи на аминокиселинни остатъци 38, 48, 55, 89, 99, 111, 136, 138, 139, 154, 179, 228, 230, 238, 266, 275, 289 или 298 на SEQ ID NO:2, където клетката произвежда клас 2:1 отношение авермектини, което е различно от отношението произведено от клетка на същия щам *S. avermitilis*, който експресира дивия-тип aveC алел.

Действително е, че тестовете за подбор, описани тук, за идентифициране мутантни алели на aveC гена, експресията на които в *S. avermitilis* клетки, променя и по-специално, намалява отношението на клас 2:1 произведени авермектини. В предпочитано изпълнение, отношението B2:B1 авермектини, произведени от клетки на нов щам *S. avermitilis* на настоящото изобретение, експресиращи мутантен aveC алел или негов дегенериран вариант, на настоящото изобретение е около 1.6:1 или по-малко. В по-предпочитано изпълнение, отношението е около 1:1 или по-малко. В по-предпочитано изпълнение, отношението е около 0.84:1 или по-малко. В по-предпочитано изпълнение, отношението е около 0.80:1 или по-малко. В по-предпочитано изпълнение, отношението е около 0.75:1 или по-малко. В по-предпочитано изпълнение отношението е около 0.73:1 или по-малко. В по-предпочитано изпълнение, отношението е около 0.68:1 или по-малко. В по-предпочитано изпълнение, отношението е около 0.67:1 или по-малко. В по-предпочитано изпълнение, отношението е около 0.57:1 или по-малко. В още по-предпочитано изпълнение, отношението е около 0.53:1 или по-малко. В още по-предпочитано изпълнение, отношението е около 0.42:1 или по-малко. В още по-предпочитано изпълнение, отношението е около 0.40:1 или по-малко.

В специфично изпълнение описано по-долу, нови клетки на настоящото изобретение произвеждат циклохексил B2:циклохексил

В1 авермектини в отношение по-малко от 1.6:1. В друго специфично изпълнение, описано по-долу, нови клетки на настоящото изобретение произвеждат циклохексил В2: циклохексил В1 авермектини в отношение около 0.94:1. В следващо различно специфично изпълнение, описано по-долу, нови клетки на настоящото изобретение произвеждат циклохексил В2: циклохексил В1 авермектини в отношение около 0.88:1. В следващо различно специфично изпълнение, описано по-долу, нови клетки на настоящото изобретение произвеждат циклохексил 2: циклохексил В1 авермектини в отношение около 0.84:1. В едно следващо различно специфично изпълнение, описано по-долу, нови клетки на настоящото изобретение произвеждат циклохексил 2:циклохексил В1 авермектини в отношение около 0.75:1. В следващо различно специфично изпълнение описано по-долу, нови клетки на настоящото изобретение произвеждат циклохексил 2:циклохексил В1 авермектини в отношение около 0.73:1. В следващо различно специфично изпълнение описано по-долу, нови клетки на настоящото изобретение произвеждат циклохексил 2: циклохексил В1 авермектини в отношение около 0.68:1. В още по-следващо различно специфично изпълнение описано по-долу, нови клетки на настоящото изобретение произвеждат циклохексил 2: циклохексил В1 авермектини в отношение около 0.67:1. В още по-следващо различно специфично изпълнение описано по-долу, нови клетки на настоящото изобретение произвеждат циклохексил 2: циклохексил В1 авермектини в отношение около 0.57:1. В още по-следващо различно специфично изпълнение описано по-долу, нови клетки на настоящото изобретение произвеждат циклохексил 2:циклохексил В1 авермектини в отношение около 0.53:1. В още по-следващо различно специфично изпълнение описано по-долу, нови клетки на настоящото изобретение произвеждат циклохексил 2: циклохексил В1 авермектини в

отношение около 0.42:1. В още по-следващо различно специфично изпълнение описано по-долу, нови клетки на настоящото изобретение произвеждат циклохексил 2:циклохексил B1 авермектини в отношение около 0.40:1.

В следващо предпочитано изпълнение, настоящото изобретение предоставя нови щамове *S. avermitilis* включващи клетки, които експресират мутантен *aveC* алел или негов дегенериран вариант, или генетичен конструкт, съдържащ *aveC* алела или негов дегенериран вариант, на мястото на , или в допълнение на, дивия-тип *aveC* алел, където клетките на новия щам произвеждат променено количество авермектини, в сравнение с клетки на същия щам, които вместо това експресират само дивия-тип *aveC* алел. В предпочитано изпълнение, новият щам произвежда повишено количество авермектини. В не-ограничаващо изпълнение, генетичният конструкт по-нататък съдържа силен промотор, като силния конститутивен *ermE* промотор от *Saccharopolyspora erythraea*, пред и в оперативна връзка с *aveC* ORF.

В следващо предпочитано изпълнение, настоящото изобретение предоставя нови щамове *S. avermitilis*, включващи клетки, в които *aveC* генът е инактивиран. Такива щамове са полезни за различния спектър авермектини, които те произвеждат, в сравнение с дивия-тип щам, и в комплементационни тестове за отбор, както тук е описано, за определяне дали прицелна или случайна мутагенеза на *aveC* гена засяга производството на авермектин. В едно специфично изпълнение, описано по-долу, *S. avermitilis* клетки гостоприемници, са манипулирани генно инженерно, да съдържат инактивиран *aveC* ген. Например, щам SE180-11, описан в примери по-долу, е създаден като е използван ген заменящ плазмид pSE180 (ATCC 209604) (ФИГУРА 3), който е конструиран да инактивира *S. avermitilis aveC* гена чрез инсерция на *ermE* резистентен ген в *aveC* кодиращата област.

Настоящото изобретение по-нататък предоставя рекомбинантно експресирани мутантни *S. avermitilis* AveC генни продукти, кодирани от всяка от госреспоменатите полинуклеотидни молекули на изобретението и методи за получаване на същите.

Настоящото изобретение предоставя по-нататък процес за производство на авермектини, характеризиращ се с това, че се култивират клетки на щам *S. avermitilis*, които клетки експресират мутантен *aveC* алел, кодиращ генен продукт, който променя клас 2:1 отношението на авермектини, произведени от клетки на щам *S. avermitilis*, експресиращи мутантния *aveC* алел, в сравнение с клетки на същия щам, които вместо това експресират само дивия-тип *aveC* алел, в среди за култивиране и в условия разрешаващи или индуциращи от това производството на авермектини и добиване на споменатите авермектини от културата. В предпочитано изпълнение, клас 2:1 отношението авермектини, произведени в културата от клетки експресиращи мутантния *aveC* алел, е редуцирано. Този процес осигурява повишена ефикасност при производството на търговски значими авермектини като дорамектин.

Настоящото изобретение по-нататък предоставя процес за производство на авермектини, характеризиращ се с това, че се култивират клетки на един щам *S. avermitilis*, които клетки експресират мутантен *aveC* алел или генетичен конструктор, включващ един *aveC* алел, което води до производството на променено количество авермектини, произведени от клетки на щам *S. avermitilis*, експресиращ мутантния *aveC* алел или генетичен конструктор, сравнени с клетки на същия щам, които не експресират мутантния *aveC* алел или генетичен конструктор, но вместо това експресират само дивия-тип *aveC* алел, в среди за култивиране в условия разрешаващи или индуциращи от това производството на авермектини и добиване на споменатите авермектини от културата. В предпочитано изпълнение,

количеството авермектини произведени в култура от клетки, експресиращи мутантния *aveC* алел, дегенериран вариант или генетичен конструкт, е повишено.

По-нататък настоящото изобретение предоставя нов състав от авермектини, произведен от щам на *S. avermitilis*, експресиращ мутантен *aveC* алел или негов дегенериран вариант, кодиращ генен продукт, който редуцира клас 2:1 отношението авермектини, произведени от клетки на щам на *S. avermitilis*, експресиращи мутантния *aveC* алел или дегенериран вариант, сравнени с клетки на същия щам, които вместо това експресират само дивия-тип *aveC* алел, където авермектините в новия състав са произведени в редуцирано клас 2:1 отношение, в сравнение с клас 2:1 отношението авермектини, произведени от клетки на същия щам *S. avermitilis*, които вместо това експресират само дивия-тип *aveC* алел. Новият авермектин състав може да бъде представен като произведен в изтощена ферментационна течност на културата или може да бъде добит от нея. Новият авермектин състав, може да бъде частично или съществено пречистен от културелната течност с известни биохимични техники за пречистване, като утаяване с амониев сулфат, диализа, фракционирание в зависимост от големината, йонообменна хроматография, HPLC и т.н.

5.4. Употреба на авермектини

Авермектини са високо активни противопаразитни агенти, притежаващи специална употреба като противохелминтни, ектопаразитициди, инсектициди и акарициди. Авермектин съединения, произведени съгласно методите на настоящото изобретение са полезни за всяка от тези цели. Например, авермектин съединения, произведени съгласно настоящото изобретение, са полезни за третиране на различни заболявания или състояния у хора,

по-специално където тези заболявания или състояния са предизвикани от паразитни инфекции, известни в тази област. Виж например, Ikeda and Omura, 1997, Chem.Rev. 97(7):2591-2609. По-специално, авермектин съединения, получени съгласно настоящото изобретение, са ефективни при третиране на различни заболявания или състояния, предизвикани от ендопаразити, като паразитни нематоди, които могат да инфектират хора, домашни животни, сине, овци, птици, коне или едър рогат добитък.

По-специално, авермектин съединения получени съгласно настоящото изобретение, са ефективни срещу нематоди, които инфектират хората, както и такива, които инфектират различни видове животни. Такива нематоди включват стомашно-чревни паразити като *Ancylostoma*, *Necator*, *Ascaris*, *Strongyloides*, *Trichinella*, *Capillaria*, *Trichuris*, *Enterobius*, *Dirofilaria* и паразити, които се откриват в кръвта или други тъкани или органи, като нишковидни червеи и *Strongyloides* и *Trichinella* в състояния отделени от червата .

Авермектин съединенията, получени съгласно настоящото изобретение също са полезни за третиране на ектопаразитни инфекции, включващи например, навлизане на артроподи (arthropods) у бозайници и птици, състояния предизвикани от кърлежи, въшки, червеи, бълхи, мухи месарки, щипещи насекоми, или мигриращи двукрили (dipterous) ларви, които могат да засягат едър рогат добитък и коне.

Съединенията на авермектин, получени съгласно настоящото изобретение, са полезни като инсектициди срещу домашни вредители като например, хлебарки, молци, бръмбари и домашни мухи, както и насекоми вредители на складирано зърно и селскостопански растения, които вредители включват паяци, кърлежи, листни въшки, гъсеници и правокрили (orthopterans), като скакалци и др.

Животни, които могат да бъдат третирани със съединения на авермектин, получени съгласно настоящото изобретение включват овци, едър рогат добитък, коне, елени, кози, свине, птици, включително домашни птици, кучета и котки.

Съединение на авермектин, получено съгласно настоящото изобретение, е въведено в комбинация подходяща за специфично предвиденото приложение, за отделните видове животни гостоприемници, които ще бъдат третирани и участващия паразит или насекомо. За употреба като паразитицид, едно съединение на авермектин, получено съгласно настоящото изобретение, може да бъде въведено орално във формата на капсула, болус, таблетка или течна доза или алтернативно, може да бъде въведено като вливане, или с инжекция или като имплант. Такива комбинации се изготвят с конвенционални методи, съответно на стандартната ветеринарна практика. Така, капсули, болуси (пилули) или таблетки могат да бъдат изготвени чрез смесване на активната съставка с подходящ финно разпределен разредител или носител, допълнително съдържащ дезинтегриращ агент и /или свързващо вещество като нишесте, лактоза, талк, магнезиев стеарат и др. Една доза от комбинация може да бъде изготвена чрез диспергиране на активната съставка във воден разтвор, заедно с разпръскващ или овлажняващ агент и т.н. инжектируеми комбинации могат да бъдат изготвени във формата на стерилен разтвор, който може да съдържа други вещества като например, достатъчно соли и/или глюкоза, за да се получи изотоничен с кръвта разтвор.

Такива комбинации могат да варират по отношение теглото на активната съставка, в зависимост от пациента, или вида домашно животно, което ще бъде третирано, тежестта и типа на инфекцията и телесното тегло на гостоприемника. Общо, за орално приложение доза от активно съединение от около 0.001 до 10mg за kg телесно

тегло на пациент или животно, като единична доза или в разпределени дози за период от 1 до 5 дни би била достатъчна. Обаче, може да има случаи, когато са показани по-високи или по-ниски дозировки, както е определено например, от лекаря или ветеринарния лекар, въз основа на клинични симптоми.

Като алтернатива, авермектин съединението, получено съгласно настоящото изобретение, може да бъде въведено в комбинация с храна за животни, за тази цел концентрирана хранителна добавка или предварителна смес, може да бъде приготвена за смесване с нормалната животинска храна.

За употреба като инсектицид и за третиране на селскостопански вредители, едно съединение на авермектин, получено съгласно настоящото изобретение, може да бъде приложено като спрей, прах, емулсия и подобни съответно на стандартната земеделска практика.

6. ПРИМЕР: ФЕРМЕНТАЦИЯ НА *STREPTOMYCES AVERMITILIS* И B2:B1 АВЕРМЕКТИН АНАЛИЗ

Щамове които нямат разклонена-верига 2-оксо кисела дехидрогеназна и 5-О-трансферазна активности, не произвеждат авермектини ако ферментационната среда не е допълнена с мастни киселини. Този пример демонстрира, че при такива мутанти могат да бъдат получени авермектини с широк диапазон B2:B1 отношения, когато биосинтезата е иницирана в присъствие на различни мастни киселини.

6.1. Материали и методи

Streptomyces avermitilis ATCC 53692 са съхранявани на -70°C като цял бульон, изготвен в среда за посевка състояща се от: нишесте (Nadex, Laing National) -20g; Pharmamedia (Trader's Protein, Memphis, TN) - 15g; Ardamine pH (Yeast Products Inc.) – 5 g; калциев

карбонат - 1g. Крайният обем е довеждан до 1 литър с чешмяна вода, рН е нагласено на 7.2 и средата е автоклавирана на 121°C за 25 минути.

Два ml от размразената суспензия на горния препарат, са използвани за инокулиране на шише за култивиране, съдържащо 50ml от същата среда. След 48 часа инкубация на 28°C във въртяща клатка на 180 оборота в минута, 2 ml от бульона са използвани за инокулиране на шише за култивиране съдържащо 50 ml среда за производство, състояща се от: нишесте - 80g; калциев карбонат - 7g; Pharmamedia – 5 g; двукалий хидроген фосфат – 1g; магнезиев сулфат – 1g; глутаминова киселина – 0.6 g; феросулфат хептахидрат – 0.01 g; цинков сулфат – 0.001 g; манганов сулфат – 0.001 g. Крайният обем е доведен до 1 литър с чешмяна вода, рН е нагласено на 7.2 и средата е автоклавирана на 121°C за 25 минути.

Различни субстрати от карбоксилната киселина (виж Таблица 1) са разтворени в метанол и са добавени към ферментационния бульон 24 часа след инокулацията, за получаване крайна концентрация от 0.2g/литър. Ферментационният бульон е инкубиран за 14 дни на 28°C, след това бульонът е центрофугиран (2,500 об.мин. за 2 мин.) и надстоящата течност е отстранена.

Мицелната утайка е екстрахирана с ацетон (15ml), след това с дихлорметан (30ml) и органичната фаза е отделена, филтрувана и изпарена до сухо. Остатъкът е разтворен в метанол (1ml) и е анализиран с HPLC, с Hewlett-Packard 1090 течен хроматограф, снабден със сканиращ diod-array detector set на 240nm. Използувана е Beckman Ultrasphere C-18, 5µm, 4.6 mm x 25 cm колона, подържана на 40°C. В колоната са инжектирани 25µl от горния метанолов разтвор. Елюирането е изпълнено с линеен градиент метанол-вода от 80:20 до 95:5 за 40 минути при 0.85/ml минута. Използувани са две стандартни концентрации на циклохексил В1 за калибриране на

детекторния отговор и е измервана площта под кривата за B2 и B1 авермектини.

6.2. Резултати

HPLC ретенционните времена, наблюдавани за B2 и B1 авермектини, и 2:1 отношенията, са представени в ТАБЛИЦА 1.

ТАБЛИЦА 1

Субстрат	HPLC ретенционно Време (мин.)		Отношение
	B2	B1	B2:B1
4-тетрахидропиран карбоксилска киселина	8.1	14.5	0.25
Изомаслена киселина	10.8	18.9	0.5
3-Фуроева киселина	7.6	14.6	0.62
S-(+)-2-метилмаслена к-на	12.8	21.6	1.0
Циклохексанкарбоксилска киселина	16.9	26.0	1.6
3-Тиофенкарбоксилска киселина	8.8	16.0	1.8
Циклопентанкарбоксилска киселина	14.2	23.0	2.0
3-Трифлуорометилмаслена киселина	10.9	18.8	3.9
2-Метилпентаноева к-на	14.5	24.9	4.2
Циклопентанкарбоксилска киселина	18.6	29.0	15.0

Данните представени в ТАБЛИЦА 1, демонстрират извънредно широк диапазон на B2:B1 отношения на авермектиновия продукт, показвайки значителна разлика в резултатите от дехидриращо превръщане на клас 2 съединения в клас 1 съединения, в зависимост от природата на добавената мастнокиселинна странична верига стартерна единица. Това показва, че промени в

B2:B1 отношения, които са резултат от изменения на AveC белтъка, могат да бъдат специфични за определени субстрати. Следователно, подбор на мутанти, проявяващи промени в B2:B1 отношението, получени с определен субстрат, трябва да бъде направен в присъствие на тези субстрати. Следващите примери описани по-долу, използват циклохексанкарбоксилска киселина като субстрат за подбор. Обаче, този субстрат е използван само за да даде за пример потенциала, и не е предвиден да ограничава приложимостта на настоящото изобретение.

7. ПРИМЕР: ИЗОЛИРАНЕ НА *aveC* ГЕНА

Този пример описва изолирането и характеризирането на участък от *Streptomyces avermitilis* хромозомата, който кодира AveC генния продукт. Както е представено по-долу, *aveC* генът е идентифициран като способен да модифицира отношението на циклохексил-B2 към циклохексил-B1 (B2:B1) произведени авермектини.

7.1. Материали и методи

7.1.1. Растеж на *Streptomyces* за изолиране на ДНК

Приложен е следния метод за развитие на *Streptomyces*. Единични колонии на *S. avermitilis* ATCC 31272 (единична колония изолат #2) са изолирани върху ½ сила YPD-6 съдържаща: Difco Yeast Extract – 5g; Difco Bacto-peptone – 5 g; декстроза – 2.5 g; MOPS – 5g; Difco Bacto agar – 15 g. Крайният обем е допълнен до 1 литър с вода, рН е нагласено на 7.0 и средата е автоклавирана на 121°C за 25 минути.

Мицелите развити в горната среда са използвани за инокулиране на 10ml TBS среда (Difco Tryptic Soy Broth – 30 g, в 1 литър дестилирана вода, автоклавирана на 121°C за 25 минути) в

25mm x 150 mm епруветка, която е разклащана (300об.мин.) на 28°C за 48-72 часа.

7.1.2. Изолиране на хромозомна ДНК от *Streptomyces*

Порции (0.25ml или 0.5ml) от мицели, култивирани както е описано по-горе, са поставени за 1.5ml микроепруветки и клетките са концентрирани с центрофугиране на 12,000 x g за 60 секунди. Надстоящата течност е отстранена и клетките са ресуспендирани в 0.25 ml TSE буфер (20ml 1.5M захароза, 2.5 ml 1 M Трис-HCl, pH 8.0, 2.5 ml 1M EDTA, pH 8.0 и 75 ml dH₂O), съдържащ 2 mg/ml лизозим. Пробите са инкубрани на 37°C за 20 минути с разклащане, нанесени са на AutoGen 540™ автоматизиран инструмент за изолиране на нуклеинови киселини (Integrated Separation Systems, Natick, MA) и изолиране на геномна ДНК като е използвана Cycle 159 (програма на оборудването) съгласно инструкциите на производителя.

Алтернативно, 5 ml мицели са поставени в 17 mm x 100 mm епруветка, клетките са концентрирани чрез центрофугиране на 3000 об.мин. за 5 минути и настоящата течност е отстранена. Клетките са ресуспендирани в 1ml TSE буфер, концентрирани са чрез центрофугиране на 3000 об.мин. за 5 минути и настоящата течност е отстранена. Клетките са ресуспендирани в 1ml TSE буфер, съдържащ 2mg/ml лизозим и са инкубрани на 37°C при разклащане, за 30-60 минути. След инкубация е добавен 0.5 ml 10% натриев додецил сулфат (SDS) и клетките са инкубрани на 37°C до пълно лизиране. Лизатът е инкубиран на 65°C за 10 минути, охладен е до стайна температура, разделен е в две епендорфки и е екстрахиран 1 x с 0.5 ml фенол/хлороформ (50% фенол предварително наситен с 0.5 M Трис, pH 8.0; 50% хлороформ). Водната маса е отстранена и екстрахирана 2 до 5x с хлороформ:изоамилов алкохол(24:1). ДНК е утаена чрез добавка на 1/10 обем 3 M натриев ацетат pH 4.8, като

сместа е инкубирана на лед за 10 минути, сместа е центрофугирана на 15,000 об.мин. при 5°C за 10 минути, надстоящата течност е отделена в чиста епруветка и е добавен един обем изопропанол. Сместа от надстояща течност плюс изопропанол е инкубирана на лед за 20 минути, центрофугирана е на 15,000 об.мин. за 20 минути на 5°C, настоящата течност е отстранена и утайката от ДНК е измита 1 х със 70% етанол. След изсушаване на утайката, ДНК е ресуспендирана в ТЕ буфер (10mM Трис, 1mM EDTA, pH 8.0).

7.1.3. Изолиране на плазмидна ДНК от *Streptomyces*

Порция (1ml) от мицели е поставена в 1.5 ml микроцентрифужна епруветка и клетките са концентрирани чрез центрофугиране на 12,000 об.мин. за 60 минути. Надстоящата течност е отстранена, клетките са ресуспендирани в 1.0 ml 10.3% захароза, концентрирани са чрез центрофугиране на 12,000 x g за 60 секунди и надстоящата течност е отстранена. След това клетките са ресуспендирани в 0.25 ml TSE буфер, съдържащ 2mg/ml лизозим и са инкубирани на 37°C за 20 минути при разклащане, след което са нанесени в AutoGen 540TM инструмент за автоматично изолиране на нуклеинови киселини. Плазмидна ДНК е изолирана като е използвана Cycle 106 (програма на оборудването) съгласно инструкциите на производителя.

Алтернативно, 1.5 ml мицели са поставени в 1.5 ml микроцентрифужни епруветки и клетките са концентрирани чрез центрофугиране на 12,000 x g за 60 секунди. Надстоящата течност е отстранена и клетките са ресуспендирани в 1.0 ml 10.3% захароза, концентрирани са чрез центрофугиране на 12,000 x g за 60 секунди и надстоящата течност е отстранена. Клетките са ресуспендирани в 0.5 ml TSE буфер, съдържащ 2 mg/ml лизозим и са инкубирани на 37°C за 15-30 минути. След инкубация, са добавени 0.25 ml алкален SDS (0.3

N NaOH, 2% SDS) и клетките са инкубирани на 55°C за 15-30 минути докато разтворът се избистри. Към разтвора с ДНК е добавен натриев ацетат (0.1 ml, 3M, pH 8.4), след което е инкубиран на лед за 10 минути. ДНК пробите са центрофугирани на 14,000 об.мин. за 10 минути на 5°C. Надстоящата течност е прехвърлена в чиста епруветка, добавени са 0.2 ml фенол:хлороформ (50% фенол:50% хлороформ) и сместа е разбъркана внимателно. ДНК разтворът е центрофугиран на 14,000 об.мин. за 10 мин. на 5°C и горният слой е прехвърлен в чиста епендорфка. Добавен е изопропанол (0.75 ml) и разтворът е разбъркан внимателно, след което е инкубиран на стайна температура за 20 минути. ДНК разтворът е центрофугиран на 14,000 об.мин. за 15 минути на 5°C, надстоящата течност е отстранена и утайката от ДНК е измита със 70% етанол, изсушена е и е ресуспендирана в TE буфер.

7.1.4. Изолиране на плазмидна ДНК от *E.coli*

Единична трансформирана *E.coli* колония е инокулирана в 5ml Luria-Bertani (LB) среда (Bacto-Trypton – 10g, Bact-yeast екстракт – 5g, и NaCl – 10g в 1 литър дестилирана вода, pH 7.0, автоклавирана на 121°C за 25 минути и допълнена с 100mg/μl ампицилин). Културата е инкубирана за една нощ и порция от 1 ml е поставена в 1.5 ml микроцентрифужна епруветка. Пробите от културата са нанесени на AutoGen 540™ инструмент за автоматично изолиране на нуклеинови киселини и е изолирана плазмидна ДНК като е използвана Cycle 3 (програма на оборудването), съгласно инструкциите на производителя.

7.1.5. Получаване и трансформация на

S. avermitilis протопласти

Изолирани са единични колонии от *S. avermitilis* на $\frac{1}{2}$ сила YPD-6. Използувани са мицели за инокулиране на 10ml TBS среда в 25 mm x 150 mm епруветка, които след това са инкубирани с разклащане (300 об.мин.) на 28°C за 48 часа. Използуван е 1ml мицели за инокулиране на 50 ml YEME среда. YEME средата съдържа в 1 литър: Difco Yeast Extract - 3g; Difco Bacto-peptone - 5 g; Difco Malt екстракт - 3g; захароза - 300 g. След автоклавирание на 121°C за 25 минути, са добавени следните съставки: 2.5M $MgCl_2 \cdot 6H_2O$ (отделно автоклавиран на 121°C за 25 минути) - 2ml; и глицин (20%) (стерилизиран с филтър) - 25 ml.

Мицелите са поставени да растат на 30°C за 48-72 часа и са отделени чрез центрофугиране в 50 ml центрофужна епруветка (Falcon) на 3000 об.мин. за 20 мин. Надстоящата течност е отстранена и мицелите са ресуспендирани в Р буфер, който съдържа: захароза - 205g; K_2SO_4 - 0.25g; $MgCl_2 \cdot 6H_2O$ - 2.02g; H_2O - 600 ml; K_2PO_4 (0.5%) - 10 ml; разтвор на микроелементи* -20ml; $CaCl_2 \cdot 2H_2O$ (3.68%) - 100 ml; и MES буфер (1.0 M, pH 6.5) -10 ml. (*Разтвор на микроелементи съдържа в 1 литър: $ZnCl_2$ - 40mg; $FeCl_3 \cdot 6H_2O$ - 200 mg; $CuCl_2 \cdot 2H_2O$ - 10mg; $MnCl_2 \cdot 4H_2O$ - 10 mg; $Na_2B_4O_7 \cdot 10H_2O$ - 10mg; $(NH_4)_6Mo_7O_{24} \cdot 4H_2O$ -10mg). pH е нагласявано на 6.5, крайният обем е доведен до 1 литър и средата е филтрувана гореща през 0.45 микрона филтър.

Мицелите са утаени на 3000 об.мин. за 20 минути, надстоящата течност е отстранена и мицелите са ресуспендирани в 20 ml Р буфер, съдържащ 2 mg/ml лизозим. Мицелите са инкубирани на 35°C за 15 минути при разклащане и са контролирани микроскопски за определяне степента на образуване протопласти. Когато образуването на протопласти е пълно, протопластите се центрофугират на 8000 об.мин. за 10 минути. Супернатантата е отстранена и протопластите са ресуспендирани в 10 ml Р буфер.

Протопластите са центрофугирани на 8000 об.мин. за 10 минути, надстоящата течност е отстранена, протопластите са ресуспендирани в 2 ml Р буфер и приблизително 1×10^9 протопласти са разпределени в 2.0 ml криогенни епруветки (Nalgene).

Епруветка съдържаща 1×10^9 протопласти е центрофугирана на 8000 об.мин. за 10 минути, надстоящата течност е отстранена и протопластите са ресуспендирани в 0.1 ml Р буфер. Добавени са 2 до 5 μ g трансформираща ДНК към протопластите, непосредствено последвана от добавка на 0.5 ml работен Т буфер. Т буфер съдържа: PEG-1000 (Sigma) –25 g; захароза –2.5 g; H_2O –83 ml. pH е нагласено на 8.8 с 1N NaOH (стерилизирана с филтър) и Т основен буфер е стерилизиран с филтър и съхраняван на 4°C. Работен Т буфер, изготвен същия ден когато се използва, е Т основен буфер – 8.3 ml; K_2PO_4 (4mM) – 1.0 ml; $CaCl_2 \cdot 2H_2O$ (5M) – 0.2 ml; и TES (1M, pH 8) – 0.5 ml. Всеки компонент на работния Т буфер е отделно стерилизиран с филтър.

В рамките на 20 секунди от добавянето на Т буфер към протопластите, е добавен 1.0 ml Р буфер и протопластите са центрофугирани на 8000 об.мин. за 10 мин. Надстоящата течност е отстранена и протопластите са ресуспендирани в 0.1 ml Р буфер. След това протопластите са посети на RM14 среда, съдържаща: захароза – 205g; K_2SO_4 – 0.25g; $MgCl_2 \cdot 6H_2O$ –10.12 g; глюкоза –10g; Difco Casamino Acids – 0.1g; Difco Yeast Extract – 5g; Difco Oatmeal Agar – 3g; Difco Bacto Agar – 22g; dH_2O – 800 ml. Разтворът е автоклавиран на 121°C за 25 минути. След автоклавиране, са добавени стерилни основни разтвори: K_2PO_4 (0.5%) –10ml; $CaCl_2 \cdot 2H_2O$ (5M) – 5ml; L-пролин (20%) – 15ml; MES буфер (1.0 M, pH 6.5) – 10ml) разтвор на микроелементи (същият както по-горе) – 2ml; циклохексимид основен р-р (25 mg/ml) – 40 ml; и 1N NaOH – 2ml.

Разпределени са порции от 25 ml RM14 среда на платка и платките са изсушени 24 часа преди употреба.

Протопластите са инкубирани при 95% влажност на 30°C за 20-24 часа. За подбор на тиострептон резистентни трансформанти, 1ml от буфер за покриване, съдържащ 125 µg за ml тиострептон, е нанесен равномерно върху RM14 регенерационните платки. Буферът за покриване съдържа в 100 ml: захароза – 10.3 g; разтвор на микроелементи (същия както по-горе) – 0.2 ml; и MES (1M, pH 6.5) – 1ml. Протопластите са инкубирани при 95% влажност на 30°C за 7-14 дни докато тиострептон резистентни (Thio^r) колонии станат видими.

7.1.6. Трансформиране на *Streptomyces lividans* протопласти

S.lividans TK64 (предоставен от John Innes Institute, Norwich, U.K.) в някои случаи е използван за трансформирания. Методи и препарати за растеж, образуване на протопласти и трансформиране на *S.lividans* са описани в Hopwood et al., 1985, Genetic Manipulation of *Streptomyces*, A Laboratory Manual, John Innes Foundation, Norwich, U.K. и са изпълнени както е описано там. Плазмидна ДНК е изолирана от *S.lividans* трансформанти, както е описано в Раздел 7.1.3, по-горе.

7.1.7. Ферментационен анализ на *S.avermitilis* щамове

S.avermitilis мицели, развити върху ½ сила YPD-6 за 4-7 дни, са инокулирани в 1 x 6 инча епруветки, съдържащи 8 ml от предварително направената среда и 5 mm стъклени зърна. Предварително изготвената среда съдържа: разтворимо нишесте (или финно кипяно нишесте или KOSO, Japan Corn Starch Co., Nagoya) - 20 g/L; Pharmamedia - 15g/L; Ardamine pH - 5g/L (Champlain Ind., Clifton, NJ); CaCO₃ - 2g/L; 2x bcfa ("bcfa" се отнася за разклонена верига мастни киселини), съдържащ в крайна концентрация в средата

50ppm 2-(+/-)-метил маслена киселина, 60ppm изомаслена киселина и 20 ppm изо-валерианова киселина. pH е нагласяно на 7.2 и средата е автоклавирана на 121°C за 25 минути.

Епруветката е разклащана при 17°C ъгъл и 215 об.мин. на 29°C за 3 дни. Порция от 2 ml от посятата култура е използвана за инокулиране на 300ml Erlenmeyer колба, съдържаща 25 ml среда за производство, която включва: (финно кипено нишесте или KOSO) - 160 g/L; Nutrisoy (Archer Daniels Midland, Decatur, IL) - 10 g/L; Ardamine pH - 10g/L; K_2HPO_4 - 2 g/L; $MgSO_4 \cdot 4H_2O$ - 2 g/L; $FeSO_4 \cdot 7H_2O$ - 0.02 g/L; $MnCl_2$ - 0.002 g/L; $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$ - 0.002 g/L; $CaCO_3$ - 14 g/L; 2x bcfa (както по-горе); и циклохексан карбоксилова киселина (CHC) (изготвена като 20% разтвор при pH 7.0) - 800 ppm. pH е нагласено на 6.9 и средата е автоклавирана на 121°C за 25 минути.

След инокулация, колбата е инкубирана на 29°C за 12 дни при разклащане 200 об.мин. След инкубация, проба от 2ml е изваждана от колбата, разреждана е с 8 ml метанол, разбъркана е и сместа е центрофугирана на 1,250 x g за 10 минути за утаяване на остатъците. След това надстоящата течност е анализирана с HPLC като е използваната Beckman Ultrasphere ODS колона (25 cm x 4.6 mm ID (вътрешен диаметър) със скорост на протичане 0.75 ml/мин. и детекция по абсорбция при 240 nm. Подвижната фаза е 86/8.9/5.1 метанол/вода/ацетонитрил.

7.1.8. Изолиране на *S. avermitilis* PKS гени

Космидна библиотека на *S. avermitilis* (ATCC 31272, SC-2) хромозомна ДНК е изготвена и хибридиизирана с кетосинтаза (KS) сонда, изготвена от фрагмент на *Saccharopolyspora erythraea* поликетид синтаза (PKS) ген. Подробно описание за изготвяне на космидни библиотеки, може да бъде намерено в Sambrook et al., 1989, по-горе. Подборно описание за получаване на *Streptomyces*

хромозомни ДНК библиотеки е представено в Horwood et al., 1985, по-горе. Космидни клонове, съдържащи кетосинтаза-хибридизиращи области, са идентифицирани чрез хибридизация с един 2.7 Kb *NdeI/Eco47III* фрагмент от pEX26 (любезно предоставен от Dr. P. Leadlay, Cambridge, UK). Приблизително 5ng pEX26 са хидролизирани като са използвани *NdeI* и *Eco47III*. Реакционната смес е нанесена върху 0.8% SeaPlaque GTG агарозен гел (FMC BioProducts, Rockland, ME). След електрофореза 2.7 Kb *NdeI/Eco47III* фрагментът е изрязан от гела и ДНК е отделена от гела като е използвана GELase™ от Epicentre Technologies и е приложен бързия протокол. Фрагментът 2.7Kb *NdeI/Eco47III* е белязан с [α -³²P]dCTP (дезокситидин 5'-трифосфат, тетра(триетиламониева) сол, [α -³²P]-) (NEN-Dupont, Boston, MA) като е използвана BRL Nick Translation System (BRL Life Technologies, Inc., Gaithersburg, MD) следвайки инструкциите на доставчика. Типична реакция е изпълнена с 0.05 ml обем. След добавка на 5 μ l стоп буфер, белязаната ДНК е отделена от невключените нуклеотиди като е използвана G-25 Sephadex Quick Spin™ колона (Boehringer Mannheim) следвайки инструкциите на доставчика.

Приблизително 1,800 космидни клон са подбрани с колонийна хибридизация. Идентифицирани са десет клон, които силно хибридизират със *Sacc. erythraea* KS сонда. *E. coli* колонии, съдържащи космидна ДНК са култивирани в LB течна среда и от всяка култура е изолирана космидна ДНК в AutoGen 540™ инструмент за автоматично изолиране на нуклеинови киселини, като е използвана Cycle3 (програма на оборудването), съгласно инструкциите на производителя. Рестрикционно ендонуклеазно картиране и Southern blot хибридизационни анализи разкриват, че пет от колонииите съдържат припокриващи се хромозомни области. Конструирана е *S. avermitilis* геномна *BamHI* рестрикционна карта на петте космида

(т.е. pSE65, pSE66, pSE67, pSE68, pSE69) чрез анализ на припокриващи се космиди и хибридизации (ФИГУРА 4).

7.1.9. Идентифициране на ДНК, която модулира
авермектин B2:B1 отношения и идентифициране
на aveC ORF

Използвани са следните методи за тестване на субклонирани фрагменти, произлизащи от pSE66 космидния клон, за тяхната способност да модулират авермектин B2:B1 отношения в AveC мутанти. PSE66 (5µg) е хидролизиран със *SacI* и *BamHI*. Реакционната смес е нанесена на 0.8% SeaPlaque™ GTG агарозен гел (FMC BioProducts), след електрофореза от гела е изрязан 2.9 Kb *SacI/BamHI* фрагмент и ДНК е отделена от гела като е използвана GELase™ (Epicentre Technologies) прилагайки бърз протокол. Приблизително 5µg от вектор-совалка pWHM3 (Vara et al., 1989, J.Bacteriol. 171:5872-5881) са хидролизирани със *SacI* и *BamHI*. Около 0.5 µg 2.9 Kb инсерт и 0.5 µg хидролизиран pWHM3 са смесени заедно и са инкубирани за една нощ с 1 единица лигаза (New England Biolabs, Inc., Beverly, MA) на 15°C в общ обем 20 µl, съответно инструкциите на доставчика. След инкубацията, 5 µl от лигиращата смес са инкубирани на 70°C за 10 минути, охладени са до стайна температура и са използвани за трансформиране на компетентни *E.coli* DH5a (BRL), съответно инструкциите на производителя. Плазмидна ДНК е изолирана от ампицилин резистентни трансформанти и наличието на 2.9Kb *SacI/BamHI* инсерт е потвърдено с рестрикционен анализ. Този плазмид е означен като pSE119.

Протопласти от *S. avermitilis* щам 1100-SC38 (Pfizer собствен щам) са получени и трансформирани с pSE119 както е описано в Раздел 7.1.5, по-горе. Щам 1100-SC38 е мутант, който произвежда

значително повече авермектин циклохексил-B2 формата в сравнение с авермектин циклохексил-B1 формата, когато е допълнен с циклохексан карбоксилова киселина (B2:B1 от около 30:1). PSE119 използван да трансформира *S. avermitilis* протопласти, е изолиран от *E. coli* щам GM2163 (получен от Dr.B.J.Bachmann, Curator, *E. coli* Genetic Stock Center, Yale University), *E. coli* щам DM1 (BRL), или *S. lividans* щам TK64. Изолирани са тиострептон резистентни трансформанти на щам 1100-SC38 и са анализирани с HPLC анализ на ферментационни продукти. Трансформанти на *S. avermitilis* щам 1100-SC38, съдържащи pSE119, произвеждат променено отношение на авермектин циклохексил-B2:циклохексил-B1 от около 3.7:1 (ТАБЛИЦА 2).

След като е установено, че pSE119 е способен да модулира авермектин B2:B1 отношенията в един AveC мутант, включената ДНК е секвенирана. Изолирани са приблизително 10µg pSE119 като е използван кит за изолиране на плазмидна ДНК (Quiagen, Valencia, CA), следвайки инструкциите на производителя и са секвенирани като е използван ABI 373A Automated DNA Sequencer (Автоматичен ДНК секвенатор) (Perkin Elmer, Foster City, CA). Данни от секвениране са обединени и редактирани като е използвана Генетична Компютерна Група програми (Genetic Computer Group programs) (GCG, Madison, WI). ДНК последователността и aveC ORF са представени във ФИГУРА 1 (SEQ ID NO:1).

Конструиран е нов плазмид, обозначен като pSE118 както следва. Приблизително 5µg pSE66 са хидролизирани със *SphI* и *BamHI*. Реакционната смес е нанесена на 0.8% SeaPlaque агарозен гел (FMC BioProducts), един 2.8 Kb *SphI/BamHI* фрагмент е изрязан от гела след електрофореза и ДНК е отделена от гела като е използвана GELase™ (Epicentre Technologies) прилагайки бърз протокол. Приблизително 5 µg вектор совалка pWHM3 са

хидролизирани със *SphI* и *BamHI*. Около 0.5 μ g от 2.8 Kb инсорта и 0.5 μ g от хидролизирания pWHM3 са смесени заедно и са инкубирани за една нощ с 1 единица лигаза (New England Biolabs) на 15°C в общ обем 20 μ l, съгласно инструкциите на доставчика. След инкубация, 5 μ l от лигиращата смес са инкубирани на 70°C за 10 минути, охладени са до стайна температура и са използвани да трансформират компетентни *E.coli* DH5 α клетки, съгласно инструкциите на производителя. Изолирана е плазмидна ДНК от ампицилин резистентни трансформанти и наличието на 2.8 Kb *SphI/BamHI* инсерт е потвърдено с рестрикционен анализ. Този плазмид е обозначен като pSE118. Включената ДНК в pSE118 и pSE119 се припокрива с приблизително 838 нуклеотиди (ФИГУРА 4).

Протопласти от *S. avermitilis* щам 1100-SC38 са трансформирани с pSE118 както по-горе. Тиострептон резистентни трансформанти на щам 1100-SC38 са изолирани и анализирани с HPLC анализ на ферментационни продукти. Трансформанти от *S. avermitilis* щам 1100-SC38, съдържащи pSE118 не са променени в отношенията авермектин циклохексил-B2:авермектин циклохексил-B1, сравнени със щам 1100-SC38 (ТАБЛИЦА2).

7.1.10. PCR амплификация на *aveC* гена от

S. avermitilis хромозомна ДНК

Изолиран е фрагмент ~1.2 Kb съдържащ *aveC* ORF, от *S. avermitilis* хромозомна ДНК с PCR амплификация, като са използвани праймери (зачатьци) планирани въз основа на *aveC* нуклеотидната последователност получена по-горе. PCR праймерите са доставени от Genosys Biotechnologies, Inc. (Texas). Дясно ориентираният праймер е: 5'-TCACGAAACCGGACACAC-3' (SEQ ID NO:6); и ляво ориентираният праймер е: 5'-CATGATCGCTGAACCGAG-3' (SEQ ID NO:7). PCR реакцията е

изпълнена с Deep Vent™ полимераза (New England Biolabs) в буфер предоставен от производителя и в присъствие на 300μM dNTP, 10% глицерол, 200pmol от всеки праймер, 0.1 μg матрица и 2.5 единици ензим, в краен обем 100μl, като е използван Perkin-Elmer Cetus thermal cycler. Термалният профил на първия цикъл е 95°C за 5 минути (денатуриращ етап), 60°C за 2 минути (спойващ етап) и 72°C за 2 минути (удължаващ етап). Последващите 24 цикъла имат сходен термален профил, с изключение на това, че денатуриращият етап е скъсен до 45 секунди и спойващия етап е скъсен до 1 минута.

PCR продуктът е подложен на електрофореза в 1% агарозен гел и е открита единична ДНК ивица от ~1.2 kb. Тази ДНК е пречистена от гела и е лигирана с 25ng линеаризиран, с подравнени краища pCR-Blunt вектор (Invitrogen) в 1:10 моларно вектор-към инсерт отношение, следвайки инструкциите на производителя. Сместа за лигиране е използвана да трансформира One Shot™ компетентни *E.coli* клетки (Invitrogen), следвайки инструкциите на производителя. Изолирана е плазмидна ДНК от ампицилин резистентни трансформанти и наличието на ~1.2 Kb инсерт е потвърдено с рестрикционен анализ. Този плазмид е обозначен като pSE179.

Включената чрез инсерция ДНК от pSE179 е изолирана чрез хидролиза с *Bam*HI/*Xba*I, отделена е с електрофореза, пречистена е от гела и е лигирана с вектор совалка pWHM3, който също е хидролизиран с *Bam*HI/*Xba*I, в обща ДНК концентрация от 1μg в 1:5 моларно вектор-спрямо инсерт отношение. Сместа за лигиране е използвана да трансформира компетентни *E.coli* DH5a клетки, съгласно инструкциите на производителя. Изолирана е плазмидна ДНК от ампицилин резистентни трансформанти и наличието на ~1.2 Kb инсерт е потвърдено с рестрикционен анализ. Този плазмид, който е обозначен като pSE186 (ФИГУРА 2, ATCC 209604) е

трансформиран в *E.coli* DM1 и плазмидна ДНК е изолирана от ампицилин резистентни трансформанти.

7.2. Резултати

Един 2.9 Kb *SacI/BamHI* фрагмент от pSE119 е идентифициран, който когато е трансформиран в *S. avermitilis* щам 1100-SC38, значително променя отношението B2:B1 произведен авермектин. *S. avermitilis* щам 1100-SC38 обикновено има B2:B1 отношение около 30:1, но когато са трансформирани с вектор съдържащ 2.9 Kb *SacI/BamHI* фрагмент, отношението B2:B1 авермектин намалява до около 3.7:1. Пост-ферментационен анализ на култури от трансформанти, потвърждава наличието на трансформираща ДНК.

Фрагментът 2.9 Kb pSE119 е секвениран и е идентифицирана ~0.9 Kb ORF (ФИГУРА 1) (SEQ ID NO:1), която обхваща *PstI/SphI* фрагмент, който предварително другаде е мутиран да произвежда само B2 продукти (Ikeda et al., 1995, по-горе). Сравнението на тази ORF или на нейния съответен произведен полипептид с известни данни (GenEMBL, SWISS-PROT), не показва никаква силна хомология с известни ДНК или белтъчни последователности.

ТАБЛИЦА 2 представя ферментационния анализ на *S. avermitilis* щам 1100-SC38 трансформиран с различни плаزمиди.

ТАБЛИЦА 2

<i>S. avermitilis</i> щам (трансформиращ плазмид)	№. трансформанти тестирани	Avg. B2:B1 отношение
1100-SC38 (няма)	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: КОНСТРУИРАНЕ НА S.AVERMITILIS AveC МУТАНТИ

Този пример описва конструиране на няколко различни *S. avermitilis* AveC мутанти, като се използват препаратите и методите описани по-горе. Общо описание на техниките за въвеждане мутации в даден ген в *Streptomyces* е дадено от Kierse and Hopwood, 1991, Meth.Enzym. 204:430-458. По-детайлно описание е предоставено от Anzai et al., 1988, J.Antibiot. XLI(2):226-233, и от Stutzman-Engwall et al., 1992, J.Bacteriol. 174 (1):144-154. Тези литературни данни са включени тук чрез цитат в тяхната цялост.

8.1. Инактивиране на *S. avermitilis* aveC гена

AveC мутанти, съдържащи инактивирани aveC гени са конструирани като са използвани няколко методи, както е изложено в подробности по-долу.

В първия метод, един 640 bp (базови двойки) *SphI/PstI* фрагмент, вътрешен спрямо aveC гена в pSE119 (плазмид описан в Раздел 7.1.9., по-горе), е заменен с *ermE* ген (за еритромицин резистентност) от *Sacc. erythraea*. Генът *ermE* е изолиран от pIJ4026 (предоставен от The John Innes Institute, Norwich, U.K.; виж също Bibb et al., 1985, Gene 41:357-368) чрез хидролиза с рестрикционните ензими *BglII* и *EcoRI*, последвана от електрофореза и пречистване от гела. Този ~1.7 Kb фрагмент е лигиран в pGEM7Zf (Promega), който е хидролизиран с *BamHI* и *EcoRI* и лигиращата смес е трансформирана в компетентни *E.coli* DH5 α клетки, следвайки инструкциите на производителя. Изолирана е плазмидна ДНК от ампицилин резистентни трансформанти и наличието на ~1.7 Kb

инсерт е потвърдено с рестрикционен анализ. Този плазмид е обозначен като pSE27.

PSE118 (описан в Раздел 7.1.9., по-горе) е хидролизиран със *SphI* и *BamHI*, хидролизатът е електрофорезиран и ~2.8 Kb *SphI/BamHI* инсертът е пречистен от гела. pSE119 е хидролизиран с *PstI* и *EcoRI*, хидролизатът е електрофорезиран и ~1.5 Kb *PstI/EcoRI* инсертът е пречистен от гела. Вектор совалка pWHM3 е хидролизиран с *BamHI* и *EcoRI*. pSE27 е хидролизиран с *PstI* и *SphI*, хидролизатът е електрофорезиран и ~1.7 Kb *PstI/SphI* инсертът е пречистен от гела. Всичките четири фрагменти (н.е. ~2.8 Kb, ~1.5 Kb, ~7.2 Kb, ~1.7 Kb) са лигирани заедно с 4-пътно лигиране. Сместа за лигиране е трансформирана в компетентни *E.coli* DH5 α клетки, следвайки инструкциите на производителя. Изолирана е плазмидна ДНК от ампицилин резистентни трансформанти и наличието на коректен инсерт е потвърдено с рестрикционен анализ. Този плазмид е обозначен като pSE180(ФИГУРА 3; ATCC 209604).

pSE180 е трансформиран в *S.lividans* TK64 и са идентифицирани трансформирани колонии по резистентност към тиострептон и еритромицин. Изолиран е pSE180 от *S.lividans* и е използван да трансформира *S.avermitilis* протопласти. Идентифицирани са четири тиострептон резистентни *S.avermitilis* трнсформанти и протопласти са получени и посяти в не-селективни условия в RM14 среда. След като протопластите са регенерирали, са подбрани единични колонии за наличие на резистентност към еритромицин и отсъствие на тиострептон резистентност, което показва хромозомно интегриране на инактивирания *aveC* ген и загуба на свободния репликон. Идентифициран е един *Erm^r Thio^s* трансформант и е обозначен като щам SE18011. Тотална хромозомна ДНК е изолирана от щам SE180-11, хидролизирана е с рестрикционни ензими *BamHI*, *HindIII*, *PstI* или *SphI*, анализирана е с

електрофореза в 0.8% агарозен гел, прехвърлена е на найлонови мембрани и е хибридиизирана с *ermE* сонда. Тези анализи показват, че хромозомна интеграция на *ermE* ген на резистентност и придружаващо делетиране на 640 bp *PstI/SphI* фрагмент, се появява чрез двойно кръстосано събитие (double crossover event). HPLC анализ на ферментационни продукти от щам SE18011 показва, че нормални авермектини не са повече произвеждани (ФИГУРА 5A).

Във втори метод за инактивиране на *aveC* гена, 1.7Kb *ermE* генът е отстранен от хромозомата на *S. avermitilis* щам SE180-11, оставяйки една 640bp *PstI/SphI* делеция в *aveC* гена. Конструирани са един ген заместващ плазмид както следва: pSE180 е хидролизиран частично с *XbaI* и е пречистен един ~11.4 Kb фрагмент е от гела. Ивицата ~11.4 Kb няма 1.7Kb *ermE* резистентност гена. След това ДНК е лигирана и трансформирана в *E. coli* DH5 α клетки. Плазмидна ДНК е изолирана от ампицилин резистентни трансформанти и наличието на коректен инсерт е потвърдено с рестрикционен анализ. Този плазмид, който е обозначен като pSE184 е трансформиран в *E. coli* DM1 и е изолирана плазмидна ДНК от ампицилин резистентни трансформанти. Този плазмид е използван да трансформира протопласти от *S. avermitilis* щам SE180-11. Протопласти са получени от тиострептон резистентни трансформанти от щам SE180-11 и са посяти като единични колонии на RM14. След като протопластите регенерират, са подбрани единични колонии за отсъствие на резистентност към еритромицин и тиострептон резистентност, което показва хромозомна интеграция на инактивирания *aveC* ген и загуба на свободен репликон, съдържащ *ermE* гена. Идентифициран е един *Erm^s Thio^s* трансформант и е обозначен като SE184-1-13. Ферментационен анализ на SE184-1-13 показва, че не се получават нормални авермектини и че SE184-1-13 има същия ферментационен профил както SE180-11.

При трети метод за инактивиране на *aveC* гена е въведено едно преместване на рамката в хромозомния *aveC* ген чрез добавяне две G's след C при nt позиция 471, използвайки PCR, при което се създава *BspE1* място. Наличието на инженерно създаденото *BspE1* място е полезно за откриване събитие на генна замяна. PCR праймерите са предвидени да въведат една мутация в преместването на рамката в *aveC* гена и са доставени от Genosys Biotechnologies, Inc.

Десно-ориентираният праймер е: 5'-GGTTCCGGATGCCGTTCTCG-3' (SEQ ID NO:8) и ляво-ориентираният праймер е: 5'-AACTCCGGTCGACTCCCCTTC-3' (SEQ ID NO:9). PCR условията са както е описано в Раздел 7.1.10 по-горе. PCR 666 bp продуктът е хидролизиран със *SphI* за получаване на два фрагмента от 278 bp и 388 bp, съответно. Фрагментът 388 bp е пречистен от гела.

Ген заместващият плазмид е конструиран както следва: вектор совалка pWHM3 е хидролизиран с *EcoRI* и *BamHI*. pSE119 е хидролизиран с *BamHI* и *SphI*, хидролизатът е електрофорезиран и ~840bp фрагментът е пречистен от гела. pSE119 е хидролизиран с *EcoRI* и *XmnI*, хидролизатът е анализиран с електрофореза и ~1.7 Kb фрагмент е пречистен от гел. Всички (четири фрагменти (т.е. ~7.2 Kb, ~840 bp, ~1.7 Kb и 388 bp) са лигирани в 4-пътно лигиране. Сместа за лигирне е трансформирана в компетентни *E.coli* DH5 α клетки. Изолирана е плазмидна ДНК от ампицилин резистентни трансформанти и наличието на точен инсерт е потвърдено с рестрикционен анализ и ДНК секвениращ анализ. Този плазмид, който е обозначен като pSE185, е трансформиран в *E.coli* DM1 и плазмидна ДНК е изолирана от ампицилин резистентни трансформанти. Този плазмид е използван да трансформира протопласти от *S. avermitilis* щам 1100-SC38. Тиострептон резистентни трансформанти от щам 1100-SC38 са отделени и анализирани с

HPLC анализ на ферментационни продукти. pSE185 не променя значимо B2:B1 авермектин отношенията, когато е трансформиран в *S. avermitilis* щам 1100-SC38 (ТАБЛИЦА 2).

pSE185 е използван да трансформира протопласти от *S. avermitilis*, да създаде една мутация на преместване на рамката в хромозомата на *aveC* гена. Протопласти са получени от тиострептон резистентни трансформанти и са посетени като единични колонии върху RM14. След като протопластите са регенерирани, са подбрани единични колонии за отсъствие на тиострептон резистентност. Изолирана е хромозомна ДНК от тиострептон чувствителни колонии и е направен отбор с PCR за наличието мутация на преместването на рамката интегрирана в хромозомата. PCR праймерите са планирани въз основа на *aveC* нуклеотидната последователност и са доставени от Genosys Biotechnologies, Inc. (Texas). Дясно ориентираният PCR праймер е: 5'-GCAAGGATACGGGGACTAC-3' (SEQ ID NO:10) и ляво ориентираният PCR праймер е: 5'-GAACCGACCGCCTGATAC-3' (SEQ ID NO:11) и PCR условията са както е описано в Раздел 7.1.10 по-горе. Полученият PCR продукт е 543 bp и когато е хидролизиран с *BspE1*, се наблюдават три фрагмента от 368 bp, 96 bp и 79 bp, което показва хромозомна интеграция на инактивирания *aveC* ген и загуба на свободния репликон.

Ферментационен анализ на *S. avermitilis* мутанти, съдържащи мутацията на преместване на рамката в *aveC* гена, показва, че не се произвеждат повече нормални авермектини и че тези мутанти имат същия ферментационен HPLC профил както щамове SE180-11 и SE184-1-13. Идентифициран е един Thio^s трансформант и е обозначен като щам SE 185-5a.

Допълнително е произведена една мутация в *aveC* гена, която променя nt позиция 520 от G в A, което води до промяна в кодона, кодиращ триптофан (W) в позиция 116 спрямо един

завършващ кодон. *S. avermitilis* щам с тази мутация не произвежда нормални авермектини и има същия ферментационен профил както щамове SE180-11, SE184-1-13 и SE185-5a.

Допълнително са произведени мутации в *aveC* гена, които променят: (i) nt позиция 970 от G в A, което променя аминокиселината в позиция 266 от един глицин (G) в един аспартат (D) и (ii) nt позиция 966 от T в C, което променя аминокиселината в позиция 275 от тирозин (Y) в хистидин (H). *S. avermitilis* щам с тези мутации (G256D/Y275H) не произвежда нормални авермектини и има същия ферментационен профил както щамове SE180-11, SE184-1-13 и SE185-5a.

S. avermitilis aveC инактивиращ мутант щамове SE180-11, SE184-1-13, SE185-5a и други тук предоставени, осигуряват средства за подбор, за да се определи влиянието на други мутации в *aveC* гена. pSE186, който съдържа див-тип копие на *aveC* гена, е трансформиран в *E. coli* DM1 и е изолирана плазмидна ДНК от ампицилин резистентни трансформанти. ДНК от pSE186 е използвана да трансформира протопласти от *S. avermitilis* щам SE180-11. Изолирани са тиострептон резистентни трансформанти от щам SE180-11, определено е наличието на резистентност към еритромицин и Thi^r Erm^r трансформанти са анализирани с HPLC анализ на ферментационни продукти. Наличието на функционален *aveC* ген *in trans* е в състояние да възстанови нормалното производство на авермектини от щам SE180-11 (ФИГУРА 5B).

8.2. Анализ на мутации в *aveC* гена, които променят клас B2:B1 отношения

Както е описано по-горе, *S. avermitilis* щам SE180-11, съдържащ неактивен *aveC* ген е допълнен чрез трансформация с плазмид, съдържащ функционален *aveC* ген (pSE186). Щам SE180-11

също е използван като щам гостоприемник, за характеризиране на други мутации в *aveC* гена, както е описано по-долу.

Изолирана е хромозомна ДНК от щам 1100-SC38 и е използвана като матрица за PCR амплификация на *aveC* гена. Изолирана е 1.2 Kb ORF с PCR амплификация, като са използвани праймери планирани на базата на *aveC* нуклеотидната последователност. Дясно ориентираният праймер е SEQ ID NO:6 и ляво ориентираният праймер е SEQ ID NO:7 (виж Раздел 7.1.10 по-горе). Условиата на PCR и субклонирането са описани в Раздел 7.1.10. Анализ на ДНК последователността на 1.2 Kb ORF показва една мутация в *aveC* гена, която променя nt позиция 337 от С в Т, което променя аминокиселината в позиция 55 от серин (S) във фенилаланин (F). Генът *aveC*, съдържащ S55F мутацията е субклониран в pWHM3, за да произвежда плазмид, който е обозначен като pSE187 и който е използван да трансформира протопласти от *S. avermitilis* щам SE180-11. Изолирани са тиострептон резистентни трансформанти на щам SE180-11, определено е наличието на резистентност към еритромицин и Thio^r Erm^r трансформанти са анализирани с HPLC анализ на ферментационните продукти. Наличието на *aveC* гена, кодиращ промяна на аминокиселинния остатък 55 (S55F), е в състояние да възстанови нормалното производство на авермектин на щам SE180-11 (Фиг.5C); обаче циклохексил B2:циклохексил B1 отношението е около 26:1, в сравнение със щам SE180-11 трансформиран с pSE186, който има отношение B2:B1 от около 1.6:1 (ТАБЛИЦА 3), което показва, че единична мутация (S55F) модулира количеството циклохексил-B2 произведен спрямо циклохексил-B1.

Идентифицирана е друга мутация в *aveC* гена, която променя nt позиция 862 от G в A, която променя аминокиселината в позиция 230 от глицин (G) в аспартат (A). Един *S. avermitilis* щам ,

притежаващ тази мутация (G230D), произвежда авермектини в B2:B1 отношение от около 30:1.

8.3. Мутации, които редуцират B2:B1 отношението

Конструирани са няколко мутации, които редуцират количеството произведен циклохексил-B2, спрямо циклохексил-B1, както следва.

Идентифицирана е една мутация в *aveC* гена, която променя nt позиция 588 от G в A, която променя аминокиселината в позиция 139 от аланин (A) в треонин (T). Генът *aveC*, съдържащ A139T мутацията е субклонирани в pWHM3, за получаване на плазмид, който е обозначен като pSE188 и който е използван за трансформиране на протопласти от *S. avermitilis* щам SE180-11. Изолирани са резистентни трансформанти на щам SE180-11, определено е наличието на резистентност към еритромицин и Thio^r Erm^r трансформанти са анализирани с HPLC анализ на ферментационните продукти. Наличието на мутантен *aveC* ген, кодиращ една промяна на аминокиселинен остатък 139 (A139T) е в състояние да възстанови производството на авермектин на щам SE180-11 (ФИГУРА 5D); обаче B2:B1 отношението е около 0.94:1, което показва, че тази мутация редуцира количеството произведен циклохексил-B2 спрямо циклохексил B1. Този резултат е неочакван, тъй като публикувани резултати, както и резултати от мутации описани по-горе, демонстрират само инактивиране на *aveC* гена или повишено производство на B2 формата на авермектин спрямо B1 (ТАБЛИЦА 3).

Тъй като A139T мутацията променя B2:B1 отношенията в благоприятното B1 направление, конструирана е мутация, която кодира треонин вместо един серин в аминокиселинна позиция 138. Така, pSE186 е хидролизиран с *EcoRI* и е клониран в pGEM3Zf (Promega), който е хидролизиран с *EcoRI*. Този плазмид, който е

обозначен като pSE186a, е хидролизиран с *ApaI* и *KpnI*, ДНК фрагментите са разделени в агарозен гел и два фрагмента ~3,8 Kb и ~0.4 Kb са пречистени от гела. ДНК ~1.2 Kb инсерът от pSE186 е използван като PCR матрица за вмъкване на единична базова промяна при nt позиция 585. PCR праймерите са предвидени да въведат мутация в nt позиция 585 и са доставени от Genosys Biotechnologies, Inc. (Texas). Дясно ориентираният PCR праймер е : 5'-

GGGGGCGGGCCCCGGGTGCGGAGGCGGAAATGCCCCTGGCGACG-3' (SEQ ID NO:12); и ляво ориентираният PCR праймер е : 5'-GGAACCGACCGCCTGATACA-3' (SEQ ID NO:13). PCR реакцията е изпълнена като е използван Advantage GC genomic PCR kit (Clontech Laboratories, Palo Alto, CA) в буфер предоставен от производителя, съдържащ 200μM dNTPs, 200pmol от всеки праймер, 50 ng матрица ДНК, 1.0 M GC-Melt и 1 единица KlenTaq Polymerase Mix в краен обем 50 μl. Термалният профил на първия цикъл е 94°C за 1 мин.; последван от 25 цикъла на 94°C за 30 секунди и 68°C за 2 мин.; и 1 цикъл на 68°C за 3 мин. Един PCR продукт от 295 bp е хидролизиран с *ApaI* и *KpnI* за освобождаване на 254 bp фрагмент, който е отделен с електрофореза и е пречистен от гела. Всичките три фрагмента (~3.8 Kb, ~4 Kb и 254 bp) са лигирани заедно в 3-пътно лигиране. Сместа за лигиране е трансформирана в компетентни *E.coli* DH5α клетки. Изолирана е плазмидна ДНК от ампицилин резистентни мутанти и наличието на точен инсерт е потвърдено чрез рестрикционен анализ. Този плазмид е обозначен като pSE198.

pSE198 е хидролизиран с *EcoRI*, клониран е в pWHM3, който е хидролизиран с *EcoRI* и е трансформиран в *E.coli* DH5α клетки. Изолирана е плазмидна ДНК от ампицилин резистентни трансформанти и наличието на точен инсерт е потвърдено с рестрикционен анализ и ДНК секвениращ анализ. Тази плазмидна

ДНК е трансформирана в *E.coli* DM1, изолирана е плазмидна ДНК от ампицилин резистентни трансформанти и наличието на точен инсерт е потвърдено с рестрикционен анализ. Този плазмид, който е обозначен като pSE199, е използван да трансформира протопласти от *S. avermitilis* щам SE180-11. Изолирани са тиострептон резистентни трансформанти на щам SE180-11, определено е наличието на еритромицин резистентност и Thio^r Erm^r трансформанти са анализирани с HPLC анализ на ферментационните продукти. Наличието на мутантен *aveC* ген, кодиращ промяна при аминокиселинен остатък 138 (S138T), е способно да възстанови нормалното авермектин производство на щам SE180-11; обаче, B2:B1 е 0.88:1, което показва, че тази мутация намалява количеството произведен циклохексил-B2 спрямо циклохексил-B1 (ТАБЛИЦА 3). Това B2:B1 отношение е дори по-ниско в сравнение с 0.94:1 отношението, наблюдавано с A139T мутацията, получена чрез трансформация на щам SE180-11 с pSE188, описана по-горе.

Конструирана е друга мутация, която да вмъкне един треонин на две аминокиселинни позиции 138 и 139. ДНК инсерт ~1.2 Kb от pSE186 е използван като PCR матрица. PCR праймерите са предвидени да въведат мутации в nt позиции 585 и 588 и са доставени от Genosys Biotechnologies, Inc. (Texas). Дясно ориентираният PCR праймер е: 5'-GGGGGCGGGCCCGGGTGCGGAGGCGGAAATGC-CGCTGGCGACGACC-3' (SEQ ID NO:14); и ляво ориентираният PCR праймер е: 5'-GGAACATCACGGCATTACACC-3' (SEQ ID NO:15). PCR реакцията е изпълнена като са използвани условията описани непосредствено по-горе в този Раздел. PCR продуктът от 449 bp е хидролизиран с *ApaI* и *KpnI* за освобождаване на един 254 bp фрагмент, който е отделен с електрофореза и пречистен от гела. pSE186a е хидролизиран с *ApaI* и *KpnI*, ДНК фрагментите са

разделени на агарозен гел и два фрагмента от ~3.8 Kb и ~0.4 Kb са пречистени от гела. Всичките три фрагмента (~3.8 Kb, ~0.4 Kb и 254 bp) са лигирани заедно в 3-пътно лигиране и лигиращата смес е трансформирана в компетентни *E.coli* DH5 α клетки. Изолирана е плазмидна ДНК от ампицилин резистентни трансформанти, и наличието на точен инсерт е потвърдено с рестрикционен анализ. Този плазмид е обозначен като pSE230.

pSE230 е хидролизирен с *EcoRI*, клониран е в pWHM3, който е хидролизирен с *EcoRI* и трансформиран в *E.coli* DH5 α клетки. Изолирана е плазмидна ДНК от ампицилин резистентни трансформанти и наличието на точен инсерт е потвърдено с рестрикционен анализ и ДНК секвениращ анализ. Тази плазмидна ДНК е трансформирана в *E.coli* DM1, изолирана е плазмидна ДНК от ампицилин резистентни трансформанти и наличието на точен инсерт е потвърдено с рестрикционен анализ. Този плазмид, който е обозначен като pSE231, е използван да трансформира протопласти от *S. avermitilis* щам SE180-11. Изолирани са тиострептон резистентни трансформанти на SE180-11, установено е наличието на еритромицин резистентност и Thio^r Erm^r трансформанти са анализирани чрез ферментация. Наличието на двойно мутантен *aveC* ген, кодиращ S138T/A139T е в състояние да възстанови нормално производство на авермектин в щам SE180-11; обаче B2:B1 отношението е 0.84:1, което показва, че тази мутация по-нататък намалява количеството произведен циклохексил-B2 спрямо циклохексил-B1 (ТАБЛИЦА 3), повече от намаленията осигурени чрез трансформиране на щам SE180-11 с pSE188 или pSE199, както е описано по-горе.

Конструирана е друга мутация, която по-нататък да намали количеството произведен циклохексил-B2 спрямо циклохексил B-1. Поради това, че S138T/A139T мутациите променят B2:B1 отношения в по-благоприятното B1 направление, конструирана е една мутация,

която да вмъкне един треонин в аминокиселинна позиция 138 и един фенилаланин в аминокиселинна позиция 139. ДНК инсерът ~1.2 Kb от pSE186 е използван като PCR матрица. PCR праймери са предвидени да вмъкват мутации в nt позиции 585 (променяйки G в T) и 589 (променяйки C в T) и са доставени от Genosys Biotechnologies, Inc. (Texas). Дясно ориентираният PCR праймер е: 5'-GGGGGCGGGCCCCGGGTGCGGAGGCGGAAATGCCGCTGGCGACGTT C-3' (SEQ ID NO:25) и ляво ориентираният PCR праймер е: 5'-GGAACATCACGGCATTTCACC-3' (SEQ ID NO:15). PCR реакцията е проведена като е използван Advantage GC genomic PCR kit (Clontech Laboratories, Palo Alto, CA) в буфер предоставен от производителя, включващ 200µM dNTPs, 200 pmol от всеки праймер, 50ng ДНК матрица, 1.1mM Mg ацетат, 1.0 M GC-Melt и 1 единица Tth DNA Polymerase в краен обем 50µl. Термалният профил на първия цикъл е 94°C за 1 мин.; последван от 25 цикъла на 94°C за 30 сек. и 68°C за 2 мин.; и 1 цикъл на 68°C за 3 мин. Един PCR продукт от 449 bp е хидролизиран с *ApaI* и *KpnI* за отделяне на 254 bp фрагмент, който е анализиран с електрофореза и пречистен от гела. Всичките три фрагмента (~3.8 Kb, ~0.4 Kb и 254 bp) са лигирани заедно в 3-пътно лигиране. Лигиращата течност е трансформирана в компетентни *E.coli* DH5α клетки. Изолирана е плазмидна ДНК от ампицилин резистентни трансформанти и наличието на точен инсерт е потвърдено с рестрикционен анализ. Този плазмид е обозначен като pSE238.

pSE238 е хидролизиран с *EcoRI*, клониран е в pWHM3, който е хидролизиран с *EcoRI* и е трансформиран в *E.coli* DH5α клетки. Изолирана е плазмидна ДНК от ампицилин резистентни трансформанти и наличието на точен инсерт е потвърдено с рестрикционен анализ и ДНК секвениращ анализ. Тази плазмидна ДНК е трансформирана в *E.coli* DM1, изолирана е плазмидна ДНК от

ампицилин резистентни трансформанти и наличието на точен инсерт е потвърдено с рестрикционен анализ. Този плазмид, който е обозначен като pSE239, е използван да трансформира протопласти от *S. avermitilis* щам SE180-11. Изолирани са тиострептон резистентни трансформанти на щам SE180-11, определено е наличието на резистентност към еритромицин и Thio^r Erm^r трансформанти са анализирани с HPLC анализ на ферментационни продукти. Наличието на двойно мутантен *aveC* ген, кодиращ S138T/A139T е в състояние да възстанови нормално производство на авермектини в щам SE180-11; обаче B2:B1 отношението е 0.75:1, което показва, че тази мутация по-нататък намалява количеството произведен циклохексил-B2 спрямо циклохексил-B1 (ТАБЛИЦА 3), повече от намаленията осигурени чрез трансформиране на щам SE180-11 с pSE188, pSE199 или pSE231, както е описано по-горе.

ТАБЛИЦА 3

<i>S. avermitilis</i> щам (трансформиращ плазмид)	No. трансформанти тестирани	относително B2 Conc.	относително B1 Conc.	Avg. B2:B1 отношение
SE180-11 (none)	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

Конструирани са допълнителни мутации, които по-нататък да редуцират количеството произведен циклохексил-B2 спрямо циклохексил-B1, като е използвана техника на ДНК преместване

(DNA shuffling) както е описано от Stemmer, 1994, Nature 370:389-391; и Stemmer, 1994, Proc.Natl.Acad.Sci.USA 91:10747-10751; и по-нататък описано в United States Patents 5605793, 5811238, 583072 и 5837458.

ДНК shuffled (разместени) плазмиди, съдържащи мутантни *aveC* гени, са трансформирани в компетентни *dam dcm E.coli* клетки. Изолирана е плазмидна ДНК от резистентни към ампицилин трансформанти и е използвана да трансформира протопласти от *S. avermitilis* щам SE180-11. Изолирани са резистентни към тиострептон трансформанти на щам SE180-11 и са подбрани за производно на авермектини с циклохексил-B2: циклохексил B1 отношение от 1:1 или по-малко. Определена е ДНК последователността на плазмидна ДНК от SE180-11 трансформанти, произвеждащи авермектини с B2:B1 отношение 1:1 или по-малко.

Идентифицирани са осем трансформанти, които произвеждат намалени количества циклохексил-B2 спрямо циклохексил-B1. Най-ниското B2:B1 отношение постигнато измежду тези трансформанти е 0.4:1 (ТАБЛИЦА 4). Изолирана е ДНК от всеки от осемте трансформанти и е определена ДНК последователността, за идентифициране мутациите в *aveC* гена. Мутациите са както следва.

pSE290 съдържа четири нуклеотидни мутации в nt позиция 317 от Т в А, в nt позиция 353 от С в А, в nt позиция 438 от Г в А, и в nt позиция 1155 от Т в А. Нуклеотидната промяна в nt 317 променя аминокиселината в AA позиция 48 от D в Е и нуклеотидната промяна в nt позиция 438, променя аминокиселината в AA позиция 89 от А в Т. B2:B1 отношението, получено от клетки носещи този плазмид е 0.42:1 (ТАБЛИЦА 4).

pSE 291 съдържа 4 нуклеотидни мутации в nt позиция 272 от Г в А, в nt позиция 585 от Т в А, в nt позиция 588 от Г в А и в nt

позиция 708 от G в A. Нуклеотидната промяна в nt позиция 585 променя аминокиселината в AA позиция 138 от S в T, нуклеотидната промяна в nt позиция 588 променя аминокиселината в AA позиция 139 от A в T и нуклеотидната промяна в nt позиция 708 променя аминокиселината в AA позиция 179 от G в S. B2:B, отношението получено от клетки носещи този плазмид е 0.57:1 (ТАБЛИЦА 4).

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

pSE293 съдържа 6 нуклеотидни мутации в nt 24 от A в G, в nt позиция 286 от A в C, в nt позиция 497 от T в C, в nt позиция 554 от C в T, в nt позиция 580 от T в C и в nt позиция 886 от A в T. Нуклеотидната промяна в nt позиция 286, променя аминокиселината в AA позиция 38 от Q в P, нуклеотидната промяна в nt позиция 580, променя аминокиселината в AA позиция 136 от L до P, и нуклеотидната промяна в nt позиция 886 променя аминокиселината в AA позиция 238 от E в D. B2:B1 отношението получено от клетки носещи този ензим е 0.68:1 (ТАБЛИЦА 4).

pSE294 съдържа 6 нуклеотидни мутации в nt 469 от T в C, в nt позиция 585 от T в A, в nt позиция 588 от G в A, в nt позиция 708 от G в A, в nt позиция 833 от C в T и в nt позиция 1184 от G в A. В допълнение, nts в позиции 173, 174 и 175 са делетирани. Нуклеотидната промяна в nt позиция 469 променя аминокиселината в AA позиция 99 от F в S, нуклеотидната промяна в nt позиция 585 променя аминокиселината в AA позиция 138 от S в T, нуклеотидната промяна в nt позиция 588 променя аминокиселината в AA позиция 139 от A в T и нуклеотидната промяна в nt позиция 708 променя аминокиселината от AA позиция 179 от G в S. B2:B1 отношението получено от клетки носещи този плазмид е 0.53:1 (ТАБЛИЦА 4).

pSE295 съдържа 2 нуклеотидни мутации в nt 588 от G в A и в nt 856 от T в C. Нуклеотидната промяна в nt позиция 588 променя аминокиселината в AA позиция 139 от D в T и нуклеотидната промяна в nt позиция 856 променя аминокиселината в AA позиция 228 от M в T. B2:B1 отношението получено от клетки носещи този плазмид е 0.80:1 (ТАБЛИЦА 4).

pSE296 съдържа 5 нуклеотидни мутации в nt позиция 155 от T в C, в nt позиция 505 от G в T, в nt позиция 1039 от C в T, в nt позиция 1202 от C в T и в nt позиция 1210 от T в C. Нуклеотидната промяна в nt позиция 505 променя аминокиселината в AA позиция 111 от G в V и нуклеотидната промяна в nt позиция 1039 променя аминокиселината в AA позиция 289 от P в L. B2:B1 отношението получено от клетки носещи този плазмид е 0.73:1 (ТАБЛИЦА 4).

pSE297 съдържа 4 нуклеотидни мутации в nt позиция 377 от G в T, в nt позиция 588 от G в A, в nt позиция 633 от A в G и в nt позиция 1067 от A в T. Нуклеотидната промяна в nt позиция 588 променя аминокиселината в AA позиция 139 от A в T, нуклеотидната промяна в nt позиция 633 променя аминокиселината в AA позиция 154 от K в E и нуклеотидната промяна в nt позиция 1067 променя аминокиселината в AA позиция 298 от Q в H. B2:B1 отношението получено от клетки носещи този плазмид е 0.67:1 (ТАБЛИЦА 4).

ТАБЛИЦА 4

<i>S. avermitilis</i> щам (трансформиращ плазмид)	№. трансформанти тестирани	Относително B2 Conc.	Относително B1 Conc.	Avg. B2:B1 отношение
SE180-11 (none)	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

05.03.02

SE180-11 (pSE296)	1	135	186	0.73
SE180-11 (pSE297)	1	148	221	0.67

9. ПРИМЕР: КОНСТРУИРАНЕ НА 5' ДЕЛЕЦИОННИ МУТАНТИ

Както е обяснено в Раздел 5.1, по-горе, *S. avermitilis* нуклеотидната последователност, представена във ФИГУРА 1 (SEQ ID NO:1) включва четири различни GTG кодони в bp позиции 42, 174, 177 и 180, които са потенциални стартови места. Този раздел описва конструирането на множествени делеции на 5'-областта на *aveC* ORF (ФИГУРА 1; SEQ ID NO:1), за да се помогне да се определи кои от тези кодони могат да функционират като стартови места в *aveC* ORF за белтъчна експресия.

Фрагменти от *aveC* гена различно делетирани в 5'края, са изолирани от *S. avermitilis* хромозомна ДНК с PCR амплификация. PCR праймерите са предвидени въз основа на *aveC* ДНК последователността и са доставени от Genosys Biotechnologies, Inc. Дясно ориентираните праймери са 5'-AACCCATCCGAGCCGCTC-3' (SEQ ID NO:17) (D1F1); 5'-TCGGCCTGCCAACGAAC-3' (SEQ ID NO:17) (D1F2); 5'-CCAACGAACGTGTAGTAG-3' (SEQ ID NO:18) (D1F3); и 5'-TGCAGGCGTACGTGTTTCAGC-3' (SEQ ID NP:19) (D2F2). Ляво ориентираните праймери са 5'-CATGATCGCTGAACCGA-3' (SEQ ID NO:20); 5'-CATGATCGCTGAACCGAGGA-3' (SEQ ID NO:21); и 5'-AGGAGTGTGGTGCGTCTGGA-3' (SEQ ID NO: 22). PCR реакцията е проведена както е описано в Раздел 8.3, по-горе.

PCR продуктите са разделени с електрофореза в 1% агарозен гел и са открити единични ДНК ивици от ~1.0 Kb или ~1.1

Kb. PCR продуктите са пречистени от гела и са лигирани с 25 ng линейаризиран pCR2.1 вектор (Invitrogen) в 1:10 моларно вектор-инсерт отношение, следвайки инструкциите на производителя. Смесите за лигиране са използвани да трансформират One Shot™ Competent *E.coli* клетки (Invitrogen), следвайки инструкциите на производителя. Изолирана е плазмидна ДНК от ампицилин резистентни трансформанти и наличието на инсерт е потвърдено с рестрикционен анализ и ДНК секвениращ анализ. Тези плазмиди са обозначени като pSE190 (получен с праймер D1F1), pSE191 (получен с праймер D1F2), pSE192 (получен с праймер D1F3) и pSE193 (получен с праймер D2F2).

Всяка от включените ДНКи е хидролизирана с *Bam*HI/*Xba*I, разделена е с електрофореза, пречистена е от гела и отделно лигирана с вектор совалка pWHM3, който е хидролизиран с *Bam*HI/*Xba*I в тотална концентрация на ДНК от 1μg в 1:5 моларно вектор-към-инсерт отношение. Смесите за лигиране са използвани да трансформират компетентни *E.coli* DH5α клетки. Изолирана е плазмидна ДНК от ампицилин резистентни трансформанти и наличието на инсерт е потвърдено с рестрикционен анализ. Тези плазмиди, които са обозначени като pSE194 (D1F1), pSE195 (D1F2), pSE196 (D1F3) и pSE197 (D2F2) са трансформирани всеки поотделно в *E.coli* щам DM1, изолирана е плазмидна ДНК от ампицилин резистентни трансформанти и наличието на точен инсерт е потвърдено с рестрикционен анализ. Тази ДНК е използвана да трансформира протопласти от *S. avermitilis* щам SE180-11. Изолирани са резистентни към тиострептон трансформанти на щам SE180-11, определено е наличието на резистентност към еритромицин и Thio'Erm' трансформанти са анализирани с HPLC анализ на ферментационни продукти, за определяне кои GTG места са необходими за *aveC* експресия. Резултатите показват, че GTG

кодона в позиция 42 може да бъде елиминиран без да се засяга *aveC* експресията, тъй като pSE194, pSE195 и pSE196, у всеки от които липсва GTG мястото в позиция 42, но всички от които съдържат трите GTG места в позиции 174, 177 и 180, са способни да възстановят нормалното производство на авермектин, когато са трансформирани в SE180-11. Нормалното производство на авермектин не е възстановено, когато щам SE180-11 е трансформиран с pSE197, в който липсват всичките четири GTG места (ТАБЛИЦА 5).

ТАБЛИЦА 5

<i>S. avermitilis</i> strain (трансформиращ плазмид)	No. трансформанти тестирани	относително		Avg. B2:B1 отношение
		B2 Conc.	B1 Conc.	
SE180-11 (none)	6	0	0	0
SE180-11 (pWHM3)	6	0	0	0
SE180-11 (pSE186)	6	241	152	1.58
SE180-11 (pSE194)	6	35	15	2.43
SE180-11 (pSE195)	6	74	38	1.97
SE180-11 (pSE196)	6	328	208	1.58
SE180-11 (pSE197)	12	0	0	0

10. ПРИМЕР: КЛОНИРАНЕ НА *aveC* ХОМОЛОЗИ ОТ *S.HYGROSCOPICUS* и *S.GRISEOCHROMOGENES*

Настоящото изобретение позволява *aveC* хомолог гени от други авермектин- или милбемицин-произвеждащи видове на *Streptomyces* да бъдат идентифицирани и клонирани. Например, космидна библиотека от *S.hygroscopicus* (FERM BP-1901) геномна ДНК, е хибридизирана с 1.2 Kb *aveC* сонда от *S.avermitilis*, описана

по-горе. Идентифицирани са няколко космидни клона, които силно хибридизират. Изолирана е хромозомна ДНК от тези космиди и е идентифициран един 4.9 Kb *KpnI* фрагмент, който хибридизира с *aveC* сондата. Тази ДНК е секвенирана и е идентифицирана една ORF (SEQ ID NO:3), притежаваща значителна хомология с *aveC* ORF от *S. avermitilis*. Една аминокиселинна последователност (SEQ ID NO:4) произлизаща от *S. hygroscopicus* *aveC* хомолог ORF е представена във ФИГУРА 6.

В допълнение, една космидна библиотека от *S. griseochromogenes* геномна ДНК е хибридизирана с 1.2 Kb *aveC* сонда от *S. avermitilis*, описана по-горе. Идентифицирани са няколко космидни клона, които силно хибридизират. Изолирана е хромозомна ДНК от тези космиди и е идентифициран един 5.4 Kb *PstI* фрагмент, който хибридизира с *aveC* сонда. Тази ДНК е секвенирана и е идентифицирана една *aveC* хомолог частична ORF, притежаваща значителна хомология с *aveC* ORF на *S. avermitilis*. Една производна частична аминокиселинна последователност (SEQ ID NO:5) е представена на ФИГУРА 6.

Анализ на ДНК и аминокиселинна последователност на *aveC* хомолози на *S. hygroscopicus* и *S. griseochromogenes* показва, че тези области споделят значителна хомология (~50% идентичност на последователността на аминокиселинно ниво) едина с друга и с *S. avermitilis* *aveC* ORF и *AveC* генен продукт (ФИГУРА 6).

11. ПРИМЕР: КОНСТРУИРАНЕ НА ПЛАЗМИД С

aveC ГЕН СЛЕД *ermE* ПРОМОТОРА

Субклонирана е 1.2 Kb *aveC* ORF от pSE186 в pSE34, който е векторът совалка pWHM3, притежаващ 300 bp *ermE* промотор включен чрез инсерция като един *KpnI/BamHI* фрагмент в *KpnI/BamHI* мястото на pWHM3 (виж Ward et al., 1986, Mol.Gen.Genet. 203:468-

478). pSE186 е хидролизиран с *Bam*HI и *Hind*III, хидролизатът е разделен с електрофореза, изолиран е 1.2 Kb фрагмент от агарозния гел и е лигиран с pSE34, който е хидролизиран с *Bam*HI и *Hind*III. Сместа за лигиране е трансформирана в компетентни *E.coli* DH5α клетки, съответно инструкциите на производителя. Изолирана е плазмидна ДНК от ампицилин резистентни трансформанти и наличието на 1.2 Kb инсерт е потвърдено с рестрикционен анализ. Този плазмид, който е обозначен като pSE189, е трансформиран в *E.coli* DM1 и плазмидна ДНК е изолирана от резистентни към ампицилин трансформанти. Протопласти от *S. avermitilis* щам 1100-SC38 са трансформирани с pSE189. Изолирани са резистентни към тиострептон трансформанти на щам 1100-SC38 и са анализирани с HPLC анализ на ферментационните продукти.

S. avermitilis щам 1100-SC38 трансформанти, съдържащи pSE189 са променени в отношенията на произведени авермектин циклохексил-B2:авермектин циклохексил-B1 (около 3:1) в сравнение със щам 1100-SC38 (около 34:1) и общо авермектин производството е повишено приблизително 2.4-кратно в сравнение със щам 1100-SC38, трансформиран с pSE119 (ТАБЛИЦА 6).

pSE189 също е трансформиран в протопласти на див-тип *S. avermitilis* щам. Изолирани са трансформанти резистентни към тиострептон и са анализирани с HPLC анализ на ферментационни продукти. Общо произведените авермектини с *S. avermitilis* див-тип, трансформиран с pSE189, са повишени приблизително 2.2-кратно, сравнени с див-тип *S. avermitilis* трансформиран с pSE119 (ТАБЛИЦА 6).

ТАБЛИЦА 6

S. avermitilis щам (трансформиращ плазмид)	№. Транс- форманти тестирани	относително [B2]	относително [B1]	Relative Total Avermectins	Avg. B2:B1 отношение
1100-SC38	6	155	4.8	176	33.9
1100-SC38 (pSE119)	9	239	50.3	357	4.7

S. avermitilis щам (трансформиращ плазмид)	No. Транс- форманти тестирани	относително [B2]	Relative [B1]	относително тотални Avermectins	Avg. B2:B1 отношение
1100-SC38 (pSE189)	16	546	166	849	3.3
wild type	6	59	42	113	1.41
wild type (pSE119)	6	248	151	481	1.64
wild type (pSE189)	5	545	345	1,071	1.58

**12. ПРИМЕР: ХИМЕРЕН ПЛАЗМИД СЪДЪРЖАЩ
ПОСЛЕДОВАТЕЛНОСТИ ОТ *S.AVERMITILIS* *aveC* ORF
и *S.HYGROSCOPICUS* *aveC* ХОМОЛОГ**

Конструиран е хибриден плазмид обозначен като pSE350, който съдържа един 564 bp участък от *S.hygroscopicus* *aveC* хомолог, заместващ 564 bp хомоложен участък от *S.avermitilis* *aveC* ORF (ФИГУРА 7), както следва. pSE350 е конструиран като е използвано *BsaAI* рестрикционно място, което е консервирано в двете последователности (*aveC* позиция 225) и едно *KpnI* рестрикционно място, което е налице в *S.avermitilis* *aveC* гена (*aveC* позиция 810). *KpnI* мястото е въведено в *S.hygroscopicus* ДНК с PCR, като е използван дясно ориентиран праймер 5'-CTTCAGGTGTACGTGTTTCG-3' (SEQ ID NO:23) и ляво ориентиран праймер 5'-GAACTGGTACCAGTGCCC-3' (SEQ ID

NO:24) (доставени от Genosys Biotechnologies), като са използвани PCR условия, описани в Раздел 7.1.10, по-горе. PCR продуктът е хидролизиран с *BsaAI* и *KpnI*, фрагментите са разделени с електрофореза в 1% агарозен гел и 564 bp *BsaAI/KpnI* фрагментът е изолиран от гела. pSE179 (описан в Раздел 7.1.10, по-горе) е хидролизиран с *KpnI* и *HindIII*, фрагментите са разделени с електрофореза в 1% агарозен гел и е изолиран един ~4.5 Kb фрагмент от гела. pSE179 е хидролизиран с *HindIII* и *BsaAI*, фрагментите са разделени с електрофореза в 1% агарозен гел и е изолиран един ~0.2 Kb *BsaAI/HindIII* фрагмент, изолиран от гела. Фрагментът ~4.5 Kb *HindIII/KpnI*, ~0.2 Kb *BsaAI/HindIII* фрагментът и 564 bp *BsaAI/KpnI* фрагментът от *S.hygroscopicus* са лигирани заедно в 3-пътно лигиране и лигиращата смес е трансформирана в компетентни *E.coli* DH5 α клетки. Изолирана е плазмидна ДНК от резистентни към ампицилин трансформанти и наличието на точен инсерт е потвърдено с рестрикционен анализ, използвайки *KpnI* и *AvaI*. Този плазмид е хидролизиран с *HindIII* и *XbaI* за отделяне на 1.2Kb инсерт, лигиран с pWHM3, който е хидролизиран с *HindIII* и *XbaI*. Сместа за лигиране е трансформирана в компетентни *E.coli* DH5 α клетки, изолирана е плазмидна ДНК от резистентни към ампицилин трансформанти и наличието на точен инсерт е потвърдено с рестрикционен анализ, като са използвани *HindIII* и *AvaI*. Тази плазмидна ДНК е трансформирана в *E.coli* DM1, изолирана е ДНК от резистентни към ампицилин трансформанти и наличието на точен инсерт е потвърдено с рестрикционен анализ и ДНК секвениращ анализ. Този плазмид е обозначен като pSE350 и е използван да трансформира протопласти от *S.avermitilis* щам SE180-11. Изолирани са резистентни към тиострептон трансформанти на щам SE180-11, определено е наличието на резистентност към еритромицин и Thio^r Erm^r трансформанти са анализирани с HPLC

05.03.02

анализ на ферментационни продукти. Резултатите показват, че трансформанти съдържащи *S. avermitilis*/*S. hygroscopicus* хибриден плазмид имат средно B2:B1 отношение около 109:1 (ТАБЛИЦА 7).

ТАБЛИЦА 7

<i>S. avermitilis</i> Щам (трансформиращ плазмид)	No. Трансформанти тестирани	Relative B2 Conc.	Relative B1 Conc.	Avg. B2:B1 отношение
SE180-11 (none)	8	0	0	0
SE180-11 (pWHM3)	8	0	0	0
SE180-11 (pSE350)	16	233	2	109

ДЕПОЗИТ НА БИОЛОГИЧНИ МАТЕРИАЛИ

Следният биологичен материал е вложен в American Type Culture Collection (ATCC) на 12301 Parklawn Drive, Rockville, MD, 20852, USA, на 29 януари 1998 и е определен със следните ключови номера:

Плазмид

Плазмид pSE180

Плазмид pSE186

Ключов №

209605

209604

Всички патенти, патентни заявки и публикации, цитирани по-горе са включени тук чрез цитат в тяхната цялост.

Настоящото изобретение не е ограничено в обсега на специфичните изпълнения описани тук, които са предвидени като единични илюстрации на отделните аспекти на изобретението и функционално еквивалентни методи и компоненти са в обсега на изобретението. Наистина, различни модификации на изобретението,

05.03.02

в допълнение на тези показани и описани тук, ще бъдат очевидни за специалистите в тази област от горното описание и придружаващите фигури. Такива модификации са предвидени да попадат в обсега на приложените претенции.

ПАТЕНТНИ ПРЕТЕНЦИИ

1. Полинуклеотидна молекула, съдържаща нуклеотидна последователност, която от друга страна е същата като *Streptomyces avermitilis* aveC алела, *S. avermitilis* AveC генен продукт-кодиращата последователност на плазмид pSE186 (ATCC 109604) или нуклеотидната последователност на aveC ORF на *S. avermitilis*, както е представена ФИГУРА 1 (SEQ ID NO:1), или негов дегенериран вариант, но която нуклеотидна последователност, по-нататък включва една или повече мутации, кодиращи едно аминокиселинно заместване при един или повече аминокиселинни остатъци, съответстващи на аминокиселинна позиция 38, 48, 89, 99, 111, 136, 154, 179, 228, 238, 289 или 298 на SEQ ID NO:2, така че клетки на *S. avermitilis* щам ATCC 53692, в който дивия-тип aveC алел е инактивиран и който експресира полинуклеотидната молекула, съдържаща мутантната нуклеотидна последователност, произвеждат клас 2:1 отношение авермектини, което е различно от отношението получено от клетки на *S. avermitilis* щам ATCC 53692, който вместо това експресира само дивия-тип aveC алел.
2. Полинуклеотидна молекула съгласно претенция 1, където клас 2:1 авермектините са циклохексил B2:циклохексил B1 авермектини.
3. Полинуклеотидна молекула съгласно претенция 2, където различният клас 2:1 отношение на авермектини е редуцирано отношение, сравнено с клас 2:1 отношението, получено от клетки на *S. avermitilis* щам ATCC 53692, който вместо това експресира само дивия-тип aveC алел.

4. Полинуклеотидна молекула съгласно претенция 3, където отношението на клас 2:1 авермектини е около 0.8:1 или по-малко.
5. Полинуклеотидна молекула съгласно претенция 3, където отношението на клас 2:1 авермектини е около 0.68:1 или по-малко.
6. Полинуклеотидна молекула съгласно претенция 3, където отношението на клас 2:1 авермектини е около 0.53:1 или по-малко.
7. Полинуклеотидна молекула съгласно претенция 3, където отношението на клас 2:1 авермектини е около 0.42:1 или по-малко.
8. Полинуклеотидна молекула съгласно претенция 3, където отношението на клас 2:1 авермектини е около 0.40:1 или по-малко.
9. Полинуклеотидна молекула съгласно претенция 1, където нуклеотидната последователност по-нататък съдържа една или повече мутации, кодиращи една аминокиселинна замяна при един или двата аминокиселинни остатъци, съответстващи на аминокиселинни позиции 138 и 139 на SEQ ID NO:2.
10. Полинуклеотидна молекула съгласно претенция 2, където аминокиселинните замени са подбрани от една или повече от групата състояща се от:

- (a) аминокиселинен остатък Q в позиция 38, заменен с Р или от аминокиселина, която е една консервативна замяна за Р;
 - (b) аминокиселинен остатък D в позиция 48, заменен с Е или с аминокиселина, което е консервативна замяна за Е;
 - (c) аминокиселинен остатък А в позиция 89, заменен с Т или с аминокиселина, която е консервативна замяна за Т;
 - (d) аминокиселинен остатък F в позиция 99, заменен със S или с аминокиселина, която е консервативна замяна за S;
 - (e) аминокиселинен остатък G в позиция 111, заменен с V или с аминокиселина, която е консервативна замяна за V;
 - (f) аминокиселинен остатък L в позиция 136, заменен с Р или с аминокиселина, която е консервативна замяна за Р;
 - (g) аминокиселинен остатък K в позиция 154, заменен с Е или с аминокиселина, която е консервативна замяна за Е;
 - (h) аминокиселинен остатък G в позиция 179, заменен с S или с аминокиселина, която е консервативна замяна за S;
 - (i) аминокиселинен остатък M в позиция 228, заменен с Т или с аминокиселина, която е консервативна замяна за Т;
 - (j) аминокиселинен остатък E в позиция 238, заменен с D или с аминокиселина, което е консервативна замяна за D;
 - (k) аминокиселинен остатък Р в позиция 289, заменен с L или с аминокиселина, която е консервативна замяна за L; и
 - (l) аминокиселинен остатък Q в позиция 298, заменен с H или с аминокиселина, която е консервативна замяна за H.
11. Полинуклеотидна молекула съгласно претенция 2, където комбинация от аминокиселинни остатъци е мутирана и където комбинацията е подбрана от една или повече от групата състояща се от :
- (a) аминокиселинни остатъци D48 и A89;

- (b) аминокиселинни остатъци S138, A139 и G179;
 - (c) аминокиселинни остатъци Q38, L136 и E238;
 - (d) аминокиселинни остатъци F99, S138, A139 и G179;
 - (e) аминокиселинни остатъци A139 и M228;
 - (f) аминокиселинни остатъци A111 и P289; и
 - (g) аминокиселинни остътъци A139, K154 и Q298.
12. Полинуклеотидна молекула съгласно претенция 11, където комбинацията от аминокиселинни замени е подбрана от една или повече от групата състояща се от:
- (a) D48E/A89T;
 - (b) S138T/A139T/G179S;
 - (c) Q38P/L136P/E238D;
 - (d) F99S/S138T/A139T/G179S;
 - (e) A139T/M228T;
 - (f) G111V/P289L; и
 - (g) A139T/K154E/Q298H.
13. Полинуклеотидна молекула съгласно претенция 12, където мутациите в *aveC* последователността, кодираща D48E/A89T включват базова промяна от Т в А в нуклеотидна позиция съответстваща на nt 317 на SEQ ID NO:1 и базова промяна от G в А в нуклеотидна позиция, съответстваща на nt 438 на SEQ ID NO:1.
14. Полинуклеотидната молекула съгласно претенция 13, по-нататък съдържа една базова промяна от С в А в нуклеотидна позиция съответстваща на nt 353 на SEQ ID NO:1 и една базова промяна от Т в А в нуклеотидна позиция, съответстваща на nt 1155 на SEQ ID NO:1.

15. Полинуклеотидна молекула съгласно претенция 12, където мутациите в *aveC* последователността, кодираща S138T/A139T/G179S, включва една базова промяна от Т в А в нуклеотидна позиция, съответстваща на nt 585 на SEQ ID NO:1, една базова промяна от G в А в нуклеотидна позиция, съответстваща на nt 588 на SEQ ID NO:1 и една базова промяна от G в А в нуклеотидна позиция, съответстваща на nt 708 на SEQ ID NO:1.
16. Полинуклеотидната молекула съгласно претенция 15, по-нататък включва базова промяна от G в А в нуклеотидна позиция съответстваща на nt 272 на SEQ ID NO:1.
17. Полинуклеотидна молекула съгласно претенция 12, където мутациите в *aveC* последователността, кодираща Q38P/L136P/E238D включва една базова промяна от А в С в нуклеотидна позиция, съответстваща на nt 286 на SEQ ID NO:1, една базова промяна от Т в С в нуклеотидна позиция, съответстваща на nt 580 на SEQ ID NO:1 и една базова промяна от А в Т в нуклеотидна позиция, съответстваща на nt 886 на SEQ ID NO:1.
18. Полинуклеотидна молекула съгласно претенция 17, включваща по-нататък базова промяна от А в G в нуклеотидна позиция съответстваща на nt 24 на SEQ ID NO:1, една базова промяна от Т в С в нуклеотидна позиция, съответстваща на nt 497 на SEQ ID NO:1, и една базова промяна от С в Т в нуклеотидна позиция съответстваща на nt 554 на SEQ ID NO:1.

19. Полинуклеотидна молекула съгласно претенция 12, където мутациите в *aveC* последователността, кодираща F99S/S138T/A139T/G179S включва една 3 базова чифтна делеция в нуклеотидни позиции, съответстващи на nts 173, 174 и 175 на SEQ ID NO:1, една базова промяна от Т в С в нуклеотидна позиция съответстваща на nt 469 на SEQ ID NO:1, една базова промяна от Т в А в нуклеотидна позиция съответстваща на nt 585 на SEQ ID NO: 1, една базова промяна от G в А в нуклеотидна позиция съответстваща на nt 588 на SEQ ID NO:1, и една базова промяна от G в А в нуклеотидна позиция съответстваща на nt 708 на SEQ ID NO:1.
20. Полинуклеотидна молекула съгласно претенция 19, включваща по-нататък една базова промяна от С в Т в нуклеотидна позиция съответстваща на nt 833 на SEQ ID NO:1, и една базова промяна от G в А в нуклеотидна позиция съответстваща на nt 1184 на SEQ ID NO:1.
21. Полинуклеотидна молекула съгласно претенция 12, където мутациите в *aveC* последователността, кодираща A139T/M228T, включва една базова промяна от G в А в нуклеотидна позиция съответстваща на nt 588 на SEQ ID NO:1 и една базова промяна от Т в С в нуклеотидна позиция съответстваща на nt 856 на SEQ ID NO:1.
22. Полинуклеотидна молекула съгласно претенция 12, където мутациите в *aveC* последователността, кодираща G111V/P289L включва една базова промяна от G в Т в нуклеотидна позиция

съответстваща на nt 505 на SEQ ID NO:1 и една базова промяна от С в Т в нуклеотидна позиция съответстваща на nt 1039 на SEQ ID NO:1.

23. Полинуклеотидна молекула съгласно претенция 22, включваща по-нататък една базова промяна от Т в С в нуклеотидна позиция съответстваща на nt 155 на SEQ ID NO:1, една базова промяна от С в Т в нуклеотидна позиция съответстваща на nt 1202 на SEQ ID NO:1 и една базова промяна от Т в С в нуклеотидна позиция съответстваща на nt 1210 на SEQ ID NO:1.
24. Полинуклеотидна молекула съгласно претенция 12, където мутациите в aveC последователността, кодираща A139T/K154E/Q298H включва една базова промяна от G в A в нуклеотидна позиция съответстваща на nt 588 на SEQ ID NO:1, една базова промяна от A в G в нуклеотидна позиция съответстваща на nt 633 на SEQ ID NO:1, една базова промяна от A в Т в нуклеотидна позиция съответстваща на nt 1067 на SEQ ID NO:1.
25. Полинуклеотидна последователност съгласно претенция 24, включваща по-нататък една базова промяна от G в Т в нуклеотидна позиция съответстваща на nt 377 на SEQ ID NO:1.
26. Рекомбинантен вектор съдържащ полинуклеотидната молекула съгласно претенция 1.

27. Клетка гостоприемник съдържаща полинуклеотидната молекула съгласно претенция 1 или рекомбинантен вектор съгласно претенция 26.
28. Клетка гостоприемник съгласно претенция 27, която е *Streptomyces* клетка.
29. Метод за получаване на нов щам от *S. avermitilis*, характеризиращ се с това, че се мутира *aveC* алела в клетки на щам от *S. avermitilis*, която мутация има за резултат заместване в *AveC* генния продукт на различен аминокиселинен остатък в една или повече аминокиселинни позиции, съответстващи на аминокиселинни остатъци 38, 48, 89, 99, 111, 136, 138, 139, 154, 179, 228, 238, 289 или 298 на SEQ ID NO: 2, така че клетки на *S. avermitilis* щама, в който *aveC* алелът е мутиран да произвежда един клас 2:1 отношение на авермектини, което е различно от отношението получено с клетки на същия *S. avermitilis* щам, който вместо това експресира само дивия-тип *aveC* алел.
30. Метод съгласно претенция 29, където клас 2:1 авермектини са циклохексил В2 : циклохексил В1 авермектини.
31. Метод съгласно претенция 30, където различният клас 2:1 отношение авермектини е едно редуцирано отношение.
32. Метод съгласно претенция 31, където отношението на клас 2:1 авермектини, произведени от клетки на *S. avermitilis* щама, в който *aveC* алелът е мутиран така, че е около 0.8:1 или по-малко.

33. Метод съгласно претенция 31, където отношението на клас 2:1 авермектини, произведени от клетки на *S. avermitilis* щама, в който *aveC* алелът е мутиран така, че е около 0.68:1 или по-малко.
34. Метод съгласно претенция 31, където отношението на клас 2:1 авермектини, произведени от клетки на *S. avermitilis* щама, в който *aveC* алелът е мутиран така, че е около 0.53:1 или по-малко.
35. Метод съгласно претенция 31, където отношението на клас 2:1 авермектини, произведени от клетки на *S. avermitilis* щама, в който *aveC* алелът е така мутиран, че е около 0.42:1 или по-малко.
36. Метод съгласно претенция 31, където отношението на клас 2:1 авермектини произведени от клетки на *S. avermitilis* щама, в който *aveC* алелът е мутиран така, че е около 0.40:1 или по-малко.
37. Метод съгласно претенция 31, по-нататък характеризиращ се с това, че се въвеждат една или повече мутации в *aveC* алела, който кодира една аминокиселинна замяна в един или двата аминокиселинни остатъци, съответстващи на аминокиселинни позиции 138 и 139 на SEQ ID NO: 2.
38. Метод съгласно претенция 30, където аминокиселинните замени са подбрани от една или повече от групите състоящи се от:

- (a) аминокиселинен остатък Q в позиция 38 заменен с P или с аминокиселина, която е консервативна замяна за P;
 - (b) аминокиселинен остатък D в позиция 48, заменен с E или с аминокиселина, която е консервативна замяна за E;
 - (c) аминокиселинен остатък A в позиция 89, заменен с T или с аминокиселина, която е консервативна замяна за T;
 - (d) аминокиселинен остатък F в позиция 99, заменен с S или с аминокиселина, която е консервативна замяна за S;
 - (e) аминокиселинен остатък G в позиция 111, заменен с V или с аминокиселина, която е консервативна замяна за V;
 - (f) аминокиселинен остатък L в позици 136, заменен с P или с аминокиселина, която е консервативна замяна за P;
 - (g) аминокиселинен остатък K в позиция 154, заменен с E или с аминокиселина, която е консервативна замяна за E;
 - (h) аминокиселинен остатък G в позиция 179, заменен с S или с аминокиселина, която е консервативна замяна за S;
 - (i) аминокиселинен остатък M в позиция 228, заменен с T или с аминокиселина, която е консервативна замяна за T;
 - (j) аминокиселинен остатък E в позиция 238, заменен с D или с аминокиселина, която е консервативна замяна за D;
 - (k) аминокиселинен остътък P в позиция 289, заменен с L или с аминокиселина, която е консервативна замяна за L; и
 - (l) аминокиселинен остатък Q в позиция 298, заменен с H или с аминокиселина, която е консервативна замяна за H.
39. Метод съгласно претенция 30, където aveC алелът е мутиран да кодира аминокиселинни замествания в една комбинация от аминокиселинни позиции и където комбинацията е подбрана от една или повече от групата състояща се от:
- (a) аминокиселинни остатъци D48 и A89;

- (b) аминокиселинни остатъци S138, A139 и G179;
- (c) аминокиселинни остатъци Q38, L136 и E238;
- (d) аминокиселинни остатъци F99, S138, A139 и G179;
- (e) аминокиселинни остатъци A139 и M228;
- (f) аминокиселинни остатъци G111 и P289; и
- (g) аминокиселинни остатъци A139, K154 и Q298.

40. Метод съгласно претенция 39, където комбинацията от аминокиселинни замествания е подбрана от една или повече от групата състояща се от:

- (a) D48E/A89T;
- (b) S138T/A139T/G179S;
- (c) Q38P/L136/E238D;
- (d) F99S/S138T/A139T/G179S;
- (e) A139T/M228T;
- (f) G111V/P289L; и
- (g) A139T/K154E/Q298H.

41. Метод съгласно претенция 40, където мутациите в *aveC* алела, кодиращ D48E/A89T включват една базова замяна от Т в А в нуклеотидна позиция в *aveC* алела, съответстваща на nt 317 на SEQ ID NO:1, и една базова замяна от G в А в нуклеотидна позиция в *aveC* алела, съответстваща на nt 438 на SEQ ID NO:1.

42. Метод съгласно претенция 41, характеризиращ се по-нататък с това, че се въвежда една базова промяна от С в А в нуклеотидна позиция в *aveC* алела, съответстваща на nt 353 на SEQ ID NO:1 и една базова промяна от Т в А в нуклеотидна

позиция в *aveC* алела, съответстваща на nt 1155 на SEQ ID NO:1.

43. Метод съгласно претенция 40, където мутациите в *aveC* алела, кодиращ S138T/A139T/G179S включват една базова промяна от Т в А в позиция в *aveC* алела, съответстваща на nt 585 на SEQ ID NO:1, една базова промяна от G в А в нуклеотидна позиция в *aveC* алела, съответстваща на nt 588 на SEQ ID NO:1 и една базова промяна от G в А в нуклеотидна позиция в *aveC* алела, съответстваща на nt 708 на SEQ ID NO:1.
44. Метод съгласно претенция 43, по-нататък характеризиращ се с това, че се въвежда една базова промяна от G в А в нуклеотидна позиция в *aveC*, съответстваща на nt 272 на SEQ ID NO:1.
45. Метод съгласно претенция 40, където мутациите в *aveC* алела, кодиращ Q38P/L136P/E238D включват една базова промяна от А в С в нуклеотидна позиция в *aveC* алела, съответстваща на nt 286 на SEQ ID NO:1, една базова промяна от Т в С в нуклеотидна позиция в *aveC* алела, съответстваща на nt 580 на SEQ ID NO:1 и една базова промяна от А в Т в нуклеотидна позиция в *aveC* алела съответстваща на nt 886 на SEQ ID NO:1.
46. Метод съгласно претенция 45, по-нататък характеризиращ се с това, че се въвежда една базова промяна от А в G в нуклеотидна позиция в *aveC* алел, съответстваща на nt 24 на SEQ ID NO:1, една базова промяна от Т в С в нуклеотидна позиция в *aveC* алела, съответстваща на nt 497 на SEQ ID

NO:1 и една базова промяна от С в Т в нуклеотидна позиция в *aveC* алела, съответстваща на 554 на SEQ ID NO:1.

47. Метод съгласно претенция 40, където мутациите в *aveC* алела, кодиращ F99S/S138T/A139T/G179S включват 3 базов чифт делеция в нуклеотидни позиции в *aveC* алела, съответстващи на nts 173, 174 и 175 на SEQ ID NO:1, една базова промяна от Т в С в нуклеотидна позиция в *aveC* алела, съответстваща на nt 469 на SEQ ID NO:1, една базова промяна от Т в А в нуклеотидна позиция в *aveC* алела, съответстваща на nt 585 на SEQ ID NO:1, една базова промяна от G в А в нуклеотидна позиция в *aveC* алела, съответстваща на nt 588 на SEQ ID NO:1 и една базова промяна от G в А в нуклеотидна позиция в *aveC* алела, съответстваща на nt 708 на SEQ ID NO:1.
48. Метод съгласно претенция 47, по-нататък характеризиращ се с това, че се въвежда една базова промяна от С в Т в нуклеотидна позиция в *aveC* алела, съответстваща на nt 833 на SEQ ID NO:1 и една базова промяна от G в А в нуклеотидна позиция в *aveC* алела, съответстваща на nt 1184 на SEQ ID NO:1.
49. Метод съгласно претенция 40, където мутациите в *aveC* алела, кодиращ A139T/M228T включват една базова промяна от G в А в нуклеотидна позиция в *aveC* алела, съответстваща на nt 588 на SEQ ID NO:1 и една базова промяна от Т в С в нуклеотидна позиция в *aveC* алела, съответстваща на nt 856 на SEQ ID NO:1.

50. Метод съгласно претенция 40, където мутациите в *aveC* алела, кодиращ G111V/P289L включват една базова промяна от G в T в нуклеотидна позиция на *aveC* алела, съответстваща на nt 505 на SEQ ID NO:1 и една базова промяна от C в T в нуклеотидна позиция в *aveC* алела, съответстваща на nt 1039 на SEQ ID NO:1.
51. Метод съгласно претенция 50, по-нататък характеризиращ се с това, че се въвежда една базова промяна от T в C в нуклеотидна позиция в *aveC* алела, съответстваща на nt 156 на SEQ ID NO:1, една базова промяна от C в T в нуклеотидна позиция в *aveC* алела, съответстваща на nt 1202 на SEQ ID NO:1 и една базова промяна от T в C в нуклеотидна позиция в *aveC* алела, съответстваща на nt 1210 на SEQ ID NO:1.
52. Метод съгласно претенция 40, където мутациите в *aveC* алела, кодиращ A139T/K154E/Q289H включват една базова промяна от G в A в нуклеотидна позиция в *aveC* алела, съответстваща на nt 588 на SEQ ID NO:1, една базова промяна от A в G в нуклеотидна позиция в *aveC* алела, съответстваща на nt 633 на SEQ ID NO:1 и една базова промяна от A в T в нуклеотидна позиция в *aveC* алела, съответстваща на nt 1067 на SEQ ID NO:1.
53. Метод съгласно претенция 52, по-нататък характеризиращ се с това, че се въвежда една базова промяна от G в T в нуклеотидна позиция в *aveC* алела, съответстваща на nt 377 на SEQ ID NO:1.

54. *Streptomyces avermitilis* клетка, притежаваща мутантен *aveC* алел, кодиращ AveC генен продукт, който има една или повече аминокиселинни позиции, съответстващи на аминокиселинен остатък 38, 48, 89, 99, 111, 136, 154, 179, 228, 238, 289 или 298 на SEQ ID NO:2, където клетката произвежда клас 2:1 отношение на авермектини, което е различно от отношението получено с клетка на същия *S. avermitilis* щам, но който вместо това експресира само дивия-тип *aveC* алел.
55. *S. avermitilis* клетка съгласно претенция 54, където класът 2:1 авермектини са циклохексил B2:циклохексил B1 авермектини.
56. *S. avermitilis* клетка съгласно претенция 55, където различното клас 2:1 отношение на авермектини е редуцирано отношение.
57. *S. avermitilis* клетка съгласно претенция 56, която произвежда отношение на клас 2:1 авермектии от около 0.8:1 или по-малко.
58. *S. avermitilis* клетка съгласно претенция 56, която произвежда отношение на клас 2:1 авермектини от около 0.68:1 или по-малко.
59. *S. avermitilis* клетка съгласно претенция 56, която произвежда отношение на клас 2:1 авермектини от около 0.53:1 или по-малко.
60. *S. avermitilis* клетка съгласно претенция 56, която произвежда отношение на клас 2:1 авермектини от около 0.42:1 или по-малко.

61. *S. avermitilis* клетка съгласно претенция 56, която произвежда отношение на клас 2:1 авермектини от около 0.40:1 или по-малко.
62. *S. avermitilis* клетка съгласно претенция 55, в която aveC алелът по-нататък кодира аминокиселинна замяна в един или двата аминокиселинни остатъци, съответстващи на аминокиселинни позиции 138 и 139 на SEQ ID NO:2.
63. *S. avermitilis* клетка съгласно претенция 55, където аминокиселинните замени са подбрани от една или повече от групата състояща се от:
- (a) аминокиселинен остатък Q в позиция 38, заменен с P или с аминокиселина, която е една консервативна замяна за P;
 - (b) аминокиселинен остатък D в позиция 48, заменен с E или с аминокиселина, която е една консервативна замяна за E;
 - (c) аминокиселинен остатък A в позиция 89, заменен с T или с аминокиселина, която е една консервативна замяна за T;
 - (d) аминокиселинен остатък F в позиция 99, заменен с S или с аминокиселина, която е една консервативна замяна за S;
 - (e) аминокиселинен остатък G в позиция 111, заменен с V или с аминокиселина, която е една консервативна замяна за V;
 - (f) аминокиселинен остатък L в позиция 136, заменен с P или с аминокиселина, която е една консервативна замяна за P;
 - (g) аминокиселинен остатък K в позиция 154, заменен с E или с аминокиселина, която е една консервативна замяна за E;
 - (h) аминокиселинен остатък G в позиция 179, заменен с S или с аминокиселина, която е една консервативна замяна за S;

- (i) аминокиселинен остатък М в позиция 228, заменен с Т или с аминокиселина, която е една консервативна замяна за Т;
- (j) аминокиселинен остатък Е в позиция 238, заменен с D или с аминокиселина, която е една консервативна замяна за D;
- (k) аминокиселинен остатък Р в позиция 289, заменен с L или с аминокиселина, която е една консервативна замяна за L; и
- (l) аминокиселинен остатък Q в позиция 298, заменен с Н или с аминокиселина, която е една консервативна замяна за Н.

64. *S. avermitilis* клетка съгласно претенция 55, където aveC алелът е мутиран да кодира аминокиселинни замени в комбинация от аминокиселинни позиции и където комбинацията е подбрана от една или повече от групата състояща се от:

- (a) аминокиселинни остатъци D48 и A89;
- (b) аминокиселинни остатъци S138, A139 и G179;
- (c) аминокиселинни остатъци Q38, L136 и E238;
- (d) аминокиселинни остатъци F99, S138, A139 и G179;
- (e) аминокиселинни остатъци S139 и M228;
- (f) аминокиселинни остатъци G111 и P 289; и
- (g) аминокиселинни остатъци A139, K154 и Q298.

65. *S. avermitilis* клетка съгласно претенция 64, където комбинацията от аминокиселинни замени е подбрана от една или повече от групата състояща се от:

- (a) D48E/A89T;
- (b) S138T/A139T/G179S;
- (c) Q38P/L136P/E238D;
- (d) F99S/S138T/A139T/G179S;
- (e) A139T/M228T;
- (f) G111V/P289L; и

(g) A139T/K154E/Q298H.

66. *S. avermitilis* клетка съгласно претенция 65, където мутациите в *aveC* алела, кодиращ D48E/A89T включва една базова промяна от Т в А в нуклеотидна позиция в *aveC* алела, съответстваща на nt 317 на SEQ ID NO:1 и една базова промяна от G в А в нуклеотидна позиция в *aveC* алела, съответстваща на nt 438 на SEQ ID NO:1.
67. *S. avermitilis* клетка съгласно претенция 66, където мутациите в *aveC* алела, кодиращ D48E/A89T по-нататък включват една базова промяна от С в А в нуклеотидна позиция в *aveC* алела, съответстваща на nt 353 на SEQ ID NO:1 и една базова промяна от Т в А в нуклеотидна позиция в *aveC* алела, съответстваща на nt 1155 на SEQ ID NO:1.
68. *S. avermitilis* клетка съгласно претенция 65, където мутациите в *aveC* алела, кодиращ S138T/A139T/G179S включват една базова промяна от Т в А в нуклеотидна позиция в *aveC* алела, съответстваща на nt 585 на SEQ ID NO:1, една базова промяна от G в А в нуклеотидна позиция в *aveC* алела, съответстваща на nt 588 на SEQ ID NO:1 и една базова промяна от G в А в нуклеотидна позиция в *aveC* алела, съответстваща на nt 708 на SEQ ID NO:1.
69. *S. avermitilis* клетка съгласно претенция 68, където мутациите в *aveC* алела, кодиращ S138T/A139T/G179S по-нататък включват една базова промяна от G в А в нуклеотидна позиция в *aveC* алела, съответстващ на nt 272 на SEQ ID NO:1.

70. *S. avermitilis* клетка съгласно претенция 65, където мутациите в *aveC* алела, кодиращ Q38P/L136P/E238D включват една базова промяна от А в С в нуклеотидна позиция в *aveC* алела, съответстваща на nt 286 на SEQ ID NO:1, една базова промяна от Т в С в нуклеотидна позиция в *aveC* алела, съответстваща на nt 580 на SEQ ID NO:1 и една базова промяна от А в Т в нуклеотидна позиция в *aveC* алела, съответстваща на nt 886 на SEQ ID NO: 1.
71. *S. avermitilis* клетката съгласно претенция 70, където мутациите в *aveC* алела, кодиращ Q38P/L136P/E238D по-нататък включват една базова промяна от А в Г в нуклеотидна позиция в *aveC* алела, съответстваща на nt 24 на SEQ ID NO:1, една базова промяна от Т в С в нуклеотидна позиция в *aveC* алела, съответстваща на nt 497 на SEQ ID NO:1 и една базова промяна от С в Т в нуклеотидна позиция в *aveC* алела, съответстваща на nt 554 на SEQ ID NO:1.
72. *S. avermitilis* клетка съгласно претенция 65, където мутациите в *aveC* алела, кодиращ F99S/S138T/G179S включват една три базов чифт делеция в нуклеотидни позиции в *aveC* алела, съответстваща на nts 173, 174 и 175 на SEQ ID NO:1, една базова промяна от Т в С в нуклеотидна позиция в *aveC* алела, съответстваща на nt 469 на SEQ ID NO:1, една базова замяна от Т в А в нуклеотидна позиция в *aveC* алела, съответстваща на nt 585 на SEQ ID NO:1, една базова промяна от Г в А в нуклеотидна позиция в *aveC* алела, съответстваща на nt 588 на SEQ ID NO:1 и една базова промяна от Г в А в нуклеотидна позиция в *aveC* алела, съответстваща на nt 708 на SEQ ID NO:1.

73. *S. avermitilis* клетка съгласно претенция 72, където мутациите в *aveC* алела, кодиращ F99S/S138T/A139T/G179S по-нататък включват една базова промяна от С в Т в нуклеотидна позиция в *aveC* алела, съответстваща на nt 833 на SEQ ID NO:1 и една базова промяна от G в A в нуклеотидна позиция в *aveC* алела, съответстваща на nt 1184 на SEQ ID NO:1.
74. *S. avermitilis* клетка съгласно претенция 65, където мутациите в *aveC* алела, кодиращ A139T/M228T включват една базова промяна от G в A в нуклеотидна позиция в *aveC* алела, съответстваща на nt 588 на SEQ ID NO:1 и една базова промяна от Т в С в нуклеотидна позиция в *aveC* алела, съответстваща на nt 856 на SEQ ID NO:1.
75. *S. avermitilis* клетка съгласно претенция 65, където мутациите в *aveC* алела, кодиращ G111V/P289L включват една базова промяна от G в Т в нуклеотидна позиция в *aveC* алела, съответстваща на nt 505 на SEQ ID NO:1 и една базова промяна от С в Т в нуклеотидна позиция в *aveC* алела, съответстваща на nt 1039 на SEQ ID NO:1.
76. *S. avermitilis* клетка съгласно претенция 75, където мутациите в *aveC* алела, кодиращ G111V/P289L по-нататък включват една базова промяна от Т в С в нуклеотидна позиция в *aveC* алела, съответстваща на nt 155 на SEQ ID NO:1, една базова промяна от С в Т в нуклеотидна позиция в *aveC* алела, съответстваща на nt 1202 на SEQ ID NO:1 и една базова промяна от Т в С в нуклеотидна позиция в *aveC* алела, съответстваща на nt 1210 на SEQ ID NO:1.

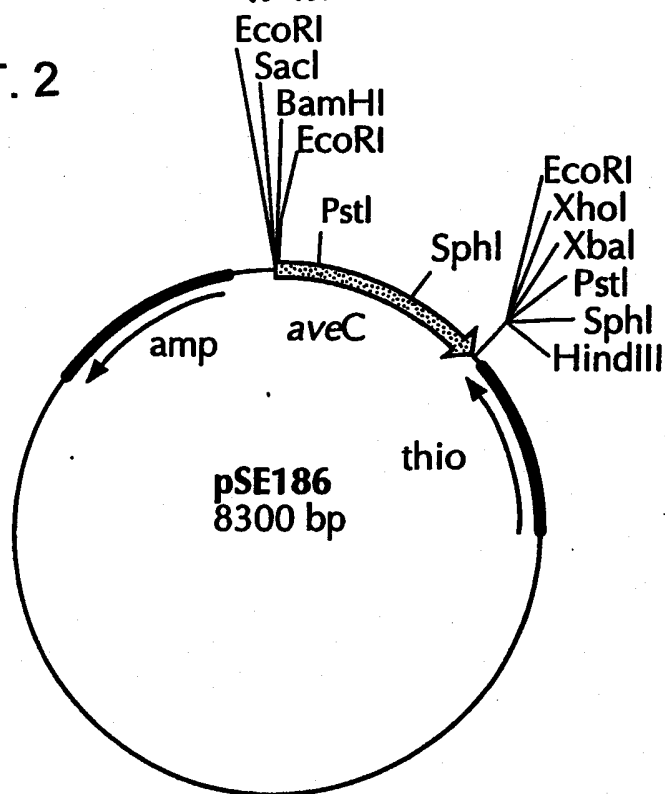
77. *S. avermitilis* клетка съгласно претенция 65, където мутациите в *aveC* алела кодиращ A139T/K154E/Q298H включват една базова промяна от G в A в нуклеотидна позиция в *aveC* алела, съответстваща на nt 588 на SEQ ID NO:1, една базова промяна от A в G в нуклеотидна позиция в *aveC* алела, съответстваща на nt 633 на SEQ ID NO:1 и една базова промяна от A в T в нуклеотидна позиция в *aveC* алела, съответстваща на nt 1067 на SEQ ID NO:1.
78. *S. avermitilis* клетка съгласно претенция 77, където мутациите в *aveC* алела кодиращ A139T/K154E/Q298H по-нататък включват една базова промяна от G в T в нуклеотидна позиция в *aveC* алела съответстваща на nt 377 на SEQ ID NO:1.
79. Процес за получаване на авермектини характеризиращ се с това, че се култивират клетките съгласно претенция 55 в среда за култивиране, в условия които разрешават или индуцират получаването от това на авермектини и добиване на споменатите авермектини от културата.
80. Състав от циклохексил B2:циклохексил B1 авермектини, получен от клетки на *Streptomyces avermitilis*, съдържащ циклохексил B2:циклохексил B1 авермектините в отношение от около 0.68:1 или по-малко в среда за култивиране, в която клетките са култивирани.
81. Състав от циклохексил H2:циклохексил B1 авермектини, получени от клетки на един щам *Streptomyces avermitilis*, които експресират мутантен *aveC* алел, кодиращ генен продукт, което

05.03.02

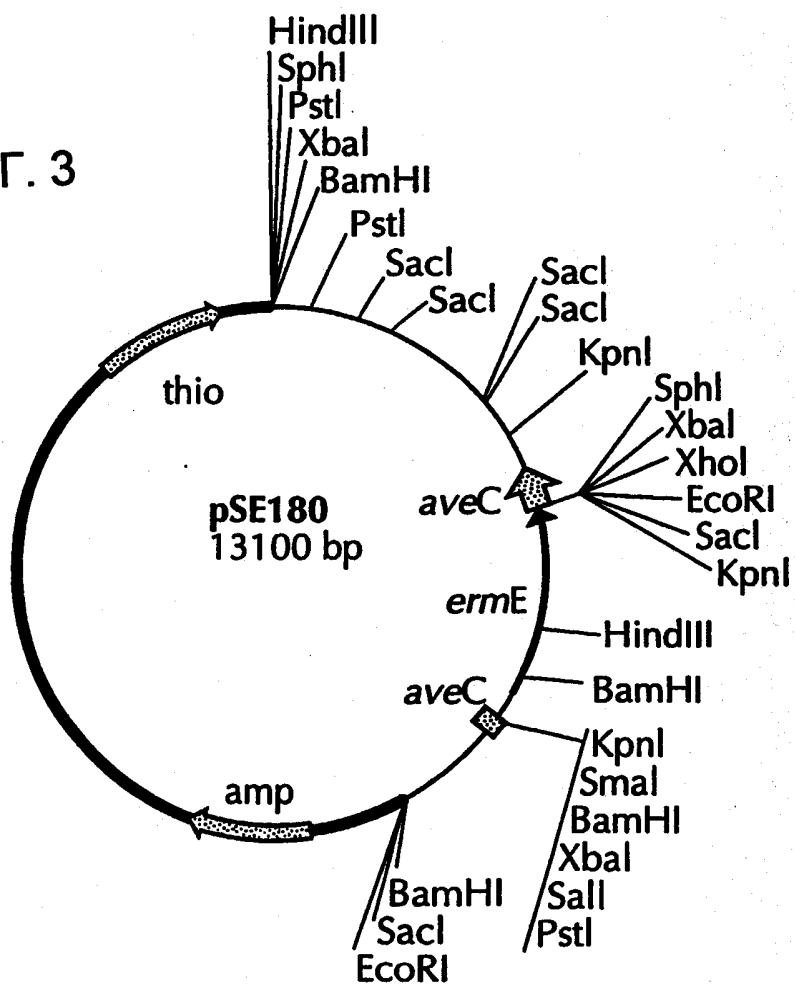
води до редуциране на клас 2:1 отношението на циклохексил В2:циклохексил В1 авермектини, получени от клетките, в сравнение с клетки на същия щам *S. avermitilis*, които не експресират мутантния *aveC* алел, но вместо това експресират само дивия-тип *aveC* алел, който състав съдържа циклохексил В2:циклохексил В1 авермектини в отношение от около 0.68:1 или по-малко в средата за култивиране, в която клетките са култивирани.

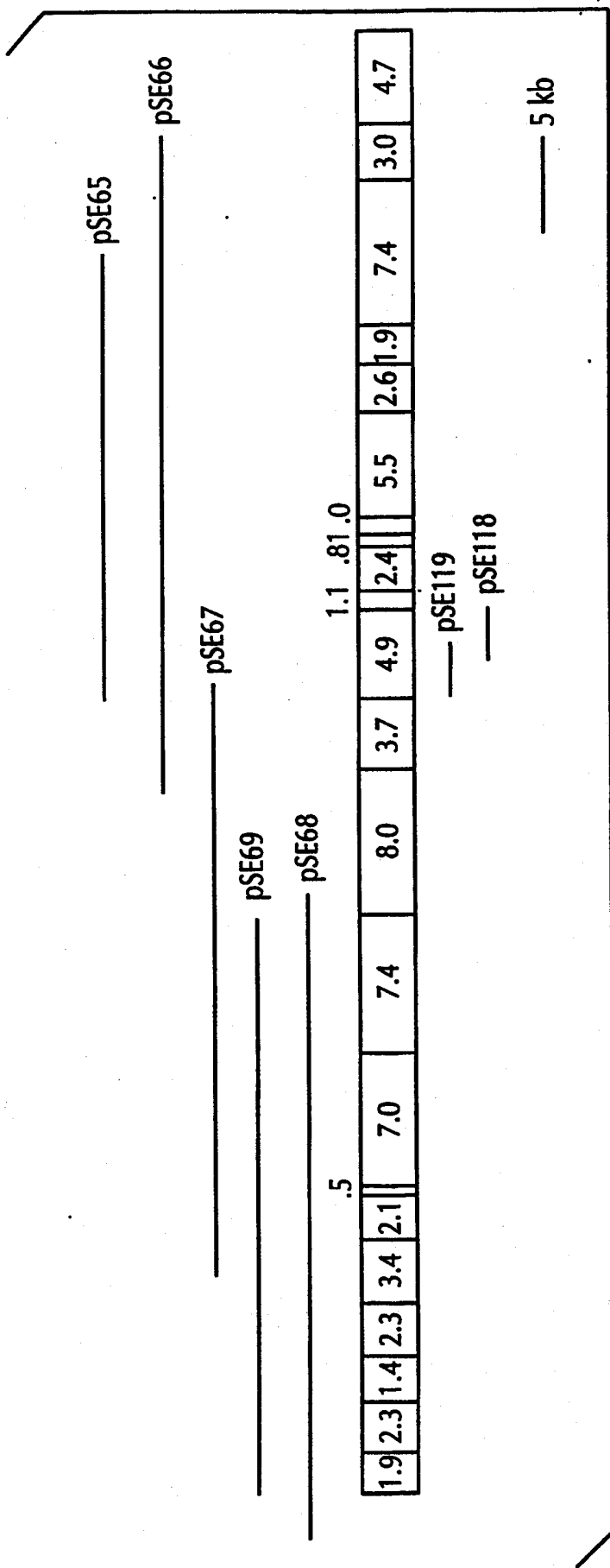
05.03.03

ФИГ. 2



ФИГ. 3





ФИГ. 4

03.03.00

3.975
4.7595.612 5.373 6.777
7.4029.957
10.573

14.1

ФИГ. 5А

4.462

5.707

6.575

7.06

7.492

8.275

9.633

11.165

11.913

12.868

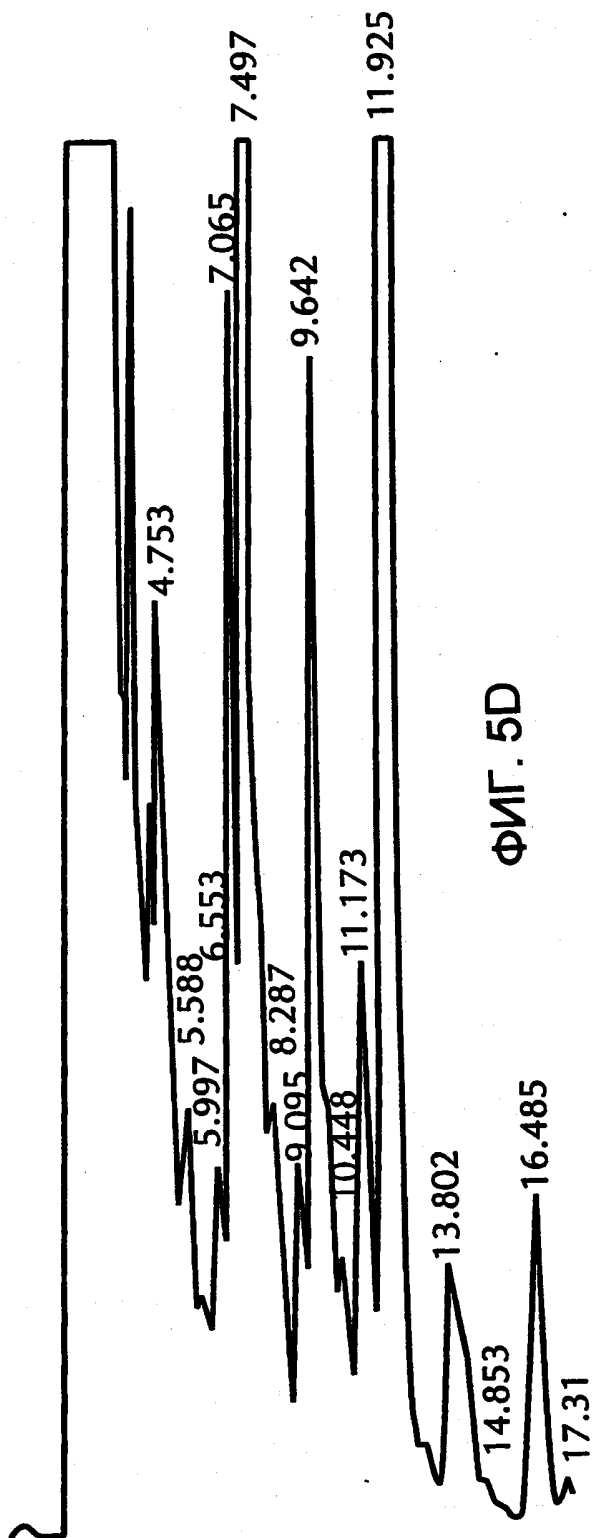
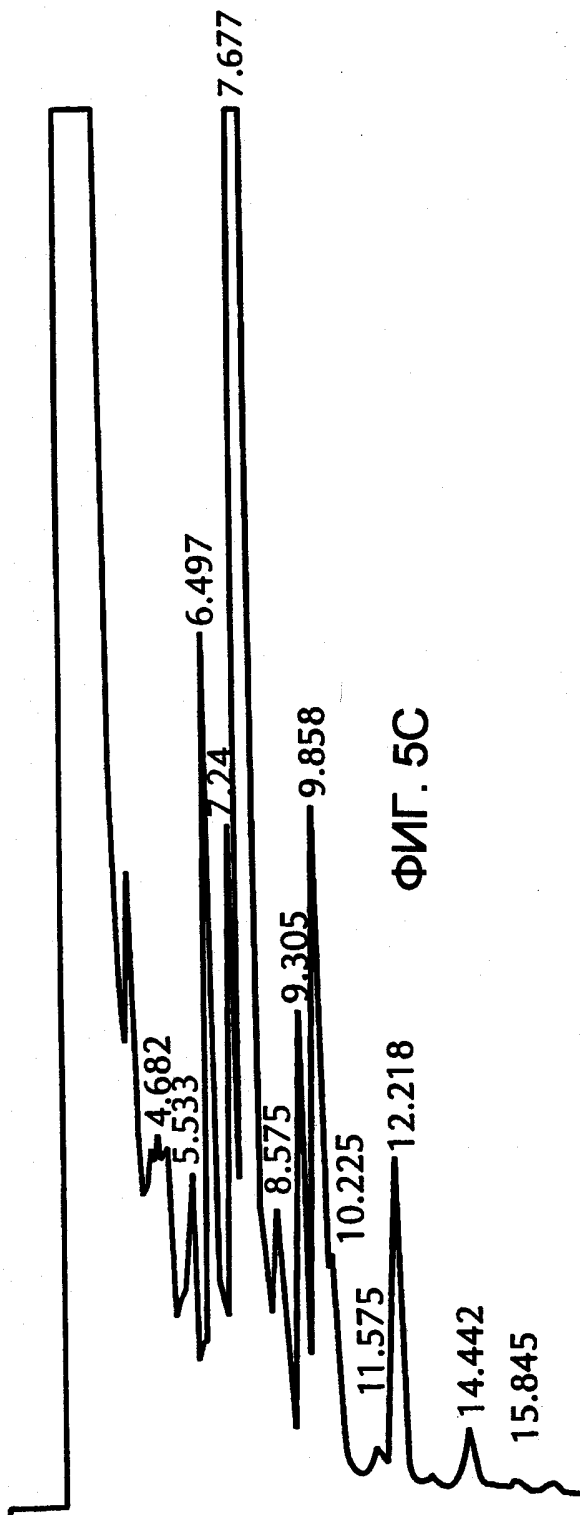
14.892

16.448

17.32

ФИГ. 5В

03.03.00



05.03.02

Фиг. 6

S. ave
S. gri
S. hyg
Cons

.....
.....
VFTLP

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

51 100
S. ave YPVISVVCIT AAAAWLFRRRC RVERRLLFDA LLFLGLLFAS WQSPLMNWFH
S. gri LPALSMAGVV GLAFWLVRRW RAERRLSFDA LLFTGVLFAG WLSPLMNWFH
S. hyg IPLLSVVGAV VLAVCLYRRC RARRRLTFDA SLFIGLLSAS WQSPLMNWIN
Cons -P-lSvvg-v -lA-wL-RRc RaeRRL-FDA lLF-GlLfAs WqSPLMNWfh

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

151 200
S. ave LCSKALGWIK ARRPARTWR LVLAVFFIGI VLGLSEPLPS ASGISVWARA
S. gri GCCQVMSRVR ERWPGVRPWQ LVGLAFLTAV AFDLSEPFIS FAGVSVWARA
S. hyg ACGKGMGLAA ARWPRLGPLR LIALGFLLVV LLDIAEPLVS FAGVSVWTRA
Cons -C-k-mg--- aRwP--rpwr Lv-l-F1--v -ldlsePl-S faGvSVWaRA

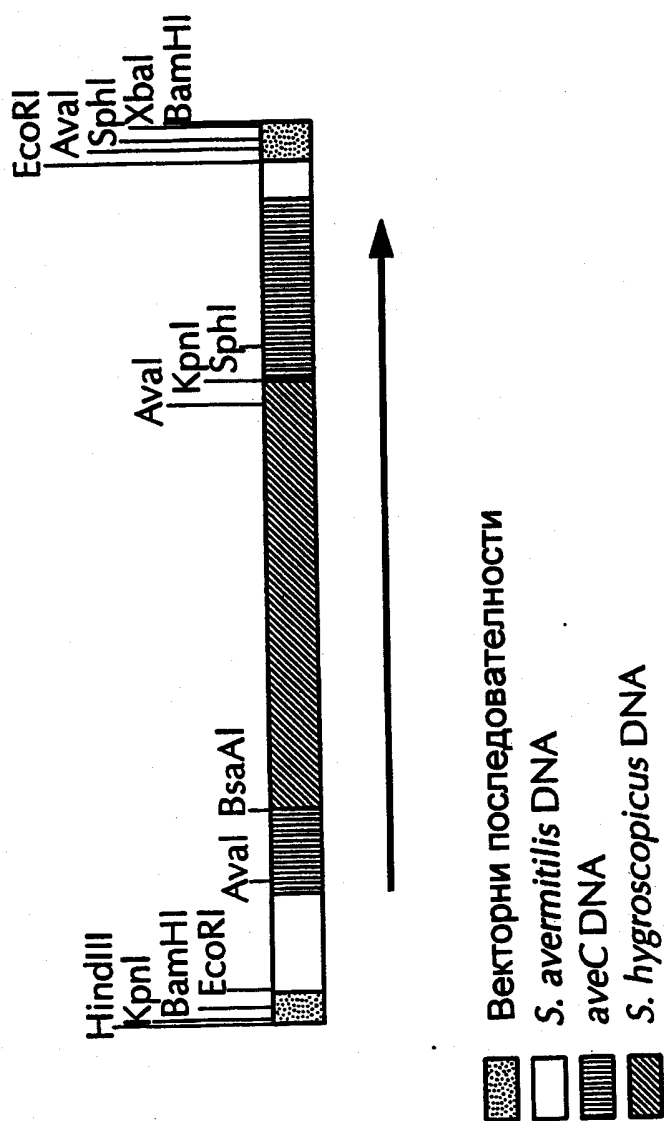
201 250
S. ave LPEVTLWSGE WYQFPVYQAV GSGLVCCMLG SLRFFRDERD ESWVERGAWR
S. gri LPTVTLWRGA WYRAR~~~~~
S. hyg VPELTIWSGH WYQFPLYQMV ASALFGASLG AARHFRNRRG ETCLESGAAL
Cons lPevTlWsG- WYqfp-yq-v -s-l----lg --r-fr--r- e---e-ga--

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

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

05.03.02

717



ФИГ. 7

Списък на изследователските

<110> PFIZER PRODUCTS INC.

<120> STREPTOMYCES AVERMITILIS GENE DIRECTING THE RATIO OF
B2:B1 AVERMECTINS

<130> PC10650A

<140> PC10650A

<141> 1999-08-12

<150> 60,148,645

<151> 1999-08-12

<160> 25

<170> PatentIn Ver. 2.1

<210> 1

<211> 1229

<212> DNA

<213> Streptomyces avermitilis

<220>

<221> CDS

<222> (174)..(1085)

<400> 1

tcacgaaacc ggacacacca cacacacgaa ggtgagacag cgtgaaccca tccgagccgc 60

tcggcctgcc caacgaacgt gtagtagaca cccgaccgtc cgtgccacg ctctcaccgc 120

aggccggcct gaacaggtca ggagcgctgc cccgtgaact gctgtcgttg ccg gtg 176
Val
1

gtg gtg tgg gcc ggg gtc ggc ctg ctg ttt ctg gcc ctg cag gcg tac 224
Val Val Trp Ala Gly Val Gly Leu Leu Phe Leu Ala Leu Gln Ala Tyr
5 10 15

gtg ttc agc cgc tgg gcg gcc gac ggt ggc tac cgg ctg atc gag acg 272
Val Phe Ser Arg Trp Ala Ala Asp Gly Gly Tyr Arg Leu Ile Glu Thr
20 25 30

gcg ggc cag ggt cag ggc ggc agc aag gat acg ggg act acc gat gtg 320
Ala Gly Gln Gly Gln Gly Gly Ser Lys Asp Thr Gly Thr Thr Asp Val
35 40 45

gtc tat ccc gtg att tcc gtc gtc tgc atc acc gcc gcg gcg gcg tgg 368
 Val Tyr Pro Val Ile Ser Val Val Cys Ile Thr Ala Ala Ala Ala Trp
 50 55 60 65

ctc ttc cgg agg tgc cgt gtc gaa cga cgg ctg ctg ttc gac gcc ctt 416
 Leu Phe Arg Arg Cys Arg Val Glu Arg Arg Leu Leu Phe Asp Ala Leu
 70 75 80

ctc ttc ctc ggg ctg ctg ttc gcg agc tgg cag agc ccg ctc atg aac 464
 Leu Phe Leu Gly Leu Leu Phe Ala Ser Trp Gln Ser Pro Leu Met Asn
 85 90 95

tgg ttc cat tcc gtt ctc gtc tcc aac gcg agt gtg tgg ggc gcg gtg 512
 Trp Phe His Ser Val Leu Val Ser Asn Ala Ser Val Trp Gly Ala Val
 100 105 110

ggt tcc tgg ggt ccg tat gtg ccc ggc tgg cag ggg gcg ggc ccg ggt 560
 Gly Ser Trp Gly Pro Tyr Val Pro Gly Trp Gln Gly Ala Gly Pro Gly
 115 120 125

gcg gag gcg gaa atg ccg ctg gcg tcg gcc tcc gtc tgc atg tcg gct 608
 Ala Glu Ala Glu Met Pro Leu Ala Ser Ala Ser Val Cys Met Ser Ala
 130 135 140 145

ctg atc gtc acc gtg ctg tgc agc aag gca ctg ggg tgg atc aag gcc 656
 Leu Ile Val Thr Val Leu Cys Ser Lys Ala Leu Gly Trp Ile Lys Ala
 150 155 160

cgc cgg ccg gca tgg cgg acc tgg cgg ctg gtc ctg gcc gtg ttc ttc 704
 Arg Arg Pro Ala Trp Arg Thr Trp Arg Leu Val Leu Ala Val Phe Phe
 165 170 175

atc ggc atc gtg ctc ggt ctg tcc gag ccg ctg ccg tcc gcc tcc ggg 752
 Ile Gly Ile Val Leu Gly Leu Ser Glu Pro Leu Pro Ser Ala Ser Gly
 180 185 190

atc agc gta tgg gcc aga gcg ctg ccc gag gtg acc ttg tgg agt ggc 800
 Ile Ser Val Trp Ala Arg Ala Leu Pro Glu Val Thr Leu Trp Ser Gly
 195 200 205

gag tgg tac cag ttc ccc gtg tat cag gcg gtc ggt tcc ggc ctg gtc 848
 Glu Trp Tyr Gln Phe Pro Val Tyr Gln Ala Val Gly Ser Gly Leu Val
 210 215 220 225

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

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

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

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

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

gttcagggca ggtcggagga gacggagaag gggaggcgac cggagttccg gtcacctccc 1145

ctttgtgcat ggggtggacgg ggatcacgct cccatggcgg cgggctcctc cagacgcacc 1205

acactcctcg gttcagcgat catg 1229

<210> 2

<211> 303

<212> PRT

<213> Streptomyces avermitilis

<400> 2

Val Val Val Trp Ala Gly Val Gly Leu Leu Phe Leu Ala Leu Gln Ala
 1 5 10 15
 Tyr Val Phe Ser Arg Trp Ala Ala Asp Gly Gly Tyr Arg Leu Ile Glu
 20 25 30
 Thr Ala Gly Gln Gly Gln Gly Gly Ser Lys Asp Thr Gly Thr Thr Asp
 35 40 45
 Val Val Tyr Pro Val Ile Ser Val Val Cys Ile Thr Ala Ala Ala Ala
 50 55 60
 Trp Leu Phe Arg Arg Cys Arg Val Glu Arg Arg Leu Leu Phe Asp Ala
 65 70 75 80
 Leu Leu Phe Leu Gly Leu Leu Phe Ala Ser Trp Gln Ser Pro Leu Met
 85 90 95
 Asn Trp Phe His Ser Val Leu Val Ser Asn Ala Ser Val Trp Gly Ala
 100 105 110
 Val Gly Ser Trp Gly Pro Tyr Val Pro Gly Trp Gln Gly Ala Gly Pro
 115 120 125
 Gly Ala Glu Ala Glu Met Pro Leu Ala Ser Ala Ser Val Cys Met Ser
 130 135 140

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

<210> 3

<211> 1150

<212> DNA

<213> *Streptomyces hygroscopicus*

<220>

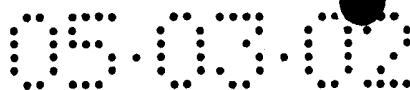
<221> CDS

<222> (58)..(990)

<400> 3

gtcgacgaag accggccgga ggccgtcggc cgggccgata ccgtacgcgg cctgcgg 57
 gtg ttc acc ctt ccc gta aca ctg tgg gcg tgt gtc ggc gcg ctg gtg 105
 Val Phe Thr Leu Pro Val Thr Leu Trp Ala Cys Val Gly Ala Leu Val
 1 5 10 15
 ctg gga ctt cag gtg tac gtg ttc gcc gcc tgg ctc gcc gac agc ggc 153
 Leu Gly Leu Gln Val Tyr Val Phe Ala Ala Trp Leu Ala Asp Ser Gly
 20 25 30
 tac cgc atc gag aag gcg tcc ccg gcc agg ggc ggt ggg gac tcg gag 201
 Tyr Arg Ile Glu Lys Ala Ser Pro Ala Arg Gly Gly Gly Asp Ser Glu
 35 40 45
 cgg atc gcc gat gtg ctg atc ccg ctg ctg tcc gtg gtg gga gcg gtg 249

Arg Ile Ala Asp Val Leu Ile Pro Leu Leu Ser Val Val Gly Ala Val	
50 55 60	
gtc ctc gca gtg tgt ctg tac cgg agg tgt cgg gcc agg agg cgg ctg	297
Val Leu Ala Val Cys Leu Tyr Arg Arg Cys Arg Ala Arg Arg Arg Leu	
65 70 75 80	
acg ttc gac gcg tcg ctc ttc atc ggg ctg ctg tcg gcc agt tgg cag	345
Thr Phe Asp Ala Ser Leu Phe Ile Gly Leu Leu Ser Ala Ser Trp Gln	
85 90 95	
agt ccc ttg atg aac tgg atc aat ccg gtg ctc gcg tca aac gtc aat	393
Ser Pro Leu Met Asn Trp Ile Asn Pro Val Leu Ala Ser Asn Val Asn	
100 105 110	
gtg ttc gga gcg gtg gcc tcg tgg ggg ccg tat gtg ccc ggt tgg cag	441
Val Phe Gly Ala Val Ala Ser Trp Gly Pro Tyr Val Pro Gly Trp Gln	
115 120 125	
ggg gcg ggg gcg cac cag gag gcc gag ctg ccg ctg gcg acc ctg agc	489
Gly Ala Gly Ala His Gln Glu Ala Glu Leu Pro Leu Ala Thr Leu Ser	
130 135 140	
atc tgt atg acg gcc atg atg gcc gcc gtg gcc tgc ggc aag ggc atg	537
Ile Cys Met Thr Ala Met Met Ala Ala Val Ala Cys Gly Lys Gly Met	
145 150 155 160	
ggt ctt gcc gcc gcc cgg tgg ccg cgg ctg ggg ccg ctc cgg ctg atc	585
Gly Leu Ala Ala Ala Arg Trp Pro Arg Leu Gly Pro Leu Arg Leu Ile	
165 170 175	
gcg ctc ggc ttt ctg ctc gtc gtg ctc ctc gac atc gcc gag ccg ctg	633
Ala Leu Gly Phe Leu Leu Val Val Leu Leu Asp Ile Ala Glu Pro Leu	
180 185 190	
gtg tcc ttc gcg ggc gtc tcc gtg tgg acg ccg gca gtg ccc gag ctg	681
Val Ser Phe Ala Gly Val Ser Val Trp Thr Arg Ala Val Pro Glu Leu	
195 200 205	
acc atc tgg agt ggg cac tgg tat cag ttc ccg ctg tat cag atg gtg	729
Thr Ile Trp Ser Gly His Trp Tyr Gln Phe Pro Leu Tyr Gln Met Val	
210 215 220	
gct tcg gcg ctc ttc ggc gcc tct ttg ggg gcc gcg cgc cac ttt cgc	777
Ala Ser Ala Leu Phe Gly Ala Ser Leu Gly Ala Ala Arg His Phe Arg	
225 230 235 240	
aac cgg cgc ggc gaa acg tgt ctg gag tcc ggg gcg gcc ctc cta ccg	825



Asn Arg Arg Gly Glu Thr Cys Leu Glu Ser Gly Ala Ala Leu Leu Pro
 245 250 255

gag ggc ccg agg cca tgg gtc cgg ctg ctg gcg gtg gtg ggc ggg gcc 873
 Glu Gly Pro Arg Pro Trp Val Arg Leu Leu Ala Val Val Gly Gly Ala
 260 265 270

aac atc agc atc gcc ctc tac acc ggc gca cac ggc gca cac atc ctg 921
 Asn Ile Ser Ile Ala Leu Tyr Thr Gly Ala His Gly Ala His Ile Leu
 275 280 285

ttc tcg ctg atg gac ggc gct ccc ccg gac cgg ctc ccc gaa ttc ttc 969
 Phe Ser Leu Met Asp Gly Ala Pro Pro Asp Arg Leu Pro Glu Phe Phe
 290 295 300

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

gcgcgatgtg cctgatgcgc ctgatgtacc cggggtgtca tcggctcacc tgtggcgcct 1080

catgcggtga gcgctccgcc tcgtccttgt tccggctcct gggctccacg accatacgga 1140

gcggccggggg 1150

<210> 4

<211> 310

<212> PRT

<213> Streptomyces hygroscopicus

<400> 4

Val Phe Thr Leu Pro Val Thr Leu Trp Ala Cys Val Gly Ala Leu Val
 1 5 10 15
 Leu Gly Leu Gln Val Tyr Val Phe Ala Ala Trp Leu Ala Asp Ser Gly
 20 25 30
 Tyr Arg Ile Glu Lys Ala Ser Pro Ala Arg Gly Gly Gly Asp Ser Glu
 35 40 45
 Arg Ile Ala Asp Val Leu Ile Pro Leu Leu Ser Val Val Gly Ala Val
 50 55 60
 Val Leu Ala Val Cys Leu Tyr Arg Arg Cys Arg Ala Arg Arg Arg Leu
 65 70 75 80
 Thr Phe Asp Ala Ser Leu Phe Ile Gly Leu Leu Ser Ala Ser Trp Gln
 85 90 95
 Ser Pro Leu Met Asn Trp Ile Asn Pro Val Leu Ala Ser Asn Val Asn
 100 105 110
 Val Phe Gly Ala Val Ala Ser Trp Gly Pro Tyr Val Pro Gly Trp Gln
 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
 145 150 155 160
 Gly Leu Ala Ala Ala Arg Trp Pro Arg Leu Gly Pro Leu Arg Leu Ile
 165 170 175
 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
 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
 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
 Arg Pro Ala Ala Gly Tyr
 305 310

<210> 5

<211> 215

<212> PRT

<213> Streptomyces griseochromogenes

<400> 5

Val Ile Gly Trp Ala Ala Leu Gly Ala Val Phe Leu Val Leu Gln Val
 1 5 10 15
 Tyr Val Phe Ala Arg Trp Thr Ala Asp Gly Gly Tyr His Leu Ala Asp
 20 25 30
 Val Ser Gly Pro Asp Gly Arg Glu Pro Gly His Arg Arg Ile Ile Asp
 35 40 45
 Val Leu Leu Pro Ala Leu Ser Met Ala Gly Val Val Gly Leu Ala Phe
 50 55 60
 Trp Leu Val Arg Arg Trp Arg Ala Glu Arg Arg Leu Ser Phe Asp Ala
 65 70 75 80

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

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

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

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

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

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

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

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

Gly Ala Trp Tyr Arg Ala Arg
210 215

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

<400> 6
tcacgaaacc ggacacac

18

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

<400> 7
catgatcgct gaaccgag

18

<210> 8
<211> 20

<212> DNA

<213> Streptomyces avermitilis

<400> 8

ggttccggat gccgttctcg

20

<210> 9

<211> 21

<212> DNA

<213> Streptomyces avermitilis

<400> 9

aactccggtc gactcccctt c

21

<210> 10

<211> 19

<212> DNA

<213> Streptomyces avermitilis

<400> 10

gcaaggatac ggggactac

19

<210> 11

<211> 18

<212> DNA

<213> Streptomyces avermitilis

<400> 11

gaaccgaccg cctgatac

18

<210> 12

<211> 43

<212> DNA

<213> Streptomyces avermitilis

<400> 12

gggggcgggc ccgggtgcgg aggcggaaat gccctggcg acg

43

<210> 13

<211> 20

<212> DNA

<213> Streptomyces avermitilis

<400> 13

ggaaccgacc gcctgataca

20

<210> 14

<211> 46

<212> DNA

<213> Streptomyces avermitilis

<400> 14

gggggcgggc ccgggtgcg aggcggaat gccgctggcg acgacc

46

<210> 15

<211> 20

<212> DNA

<213> Streptomyces avermitilis

<400> 15

ggaacatcac ggcattcacc

20

<210> 16

<211> 18

<212> DNA

<213> Streptomyces avermitilis

<400> 16

aaccatccg agccgctc

18

<210> 17

<211> 17

<212> DNA

<213> Streptomyces avermitilis

<400> 17

tcggcctgcc aacgaac

17

<210> 18

<211> 18

<212> DNA

<213> Streptomyces avermitilis

<400> 18

ccaacgaacg tgtagtag

18

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

<400> 19
tgcaggcgta cgtgttcagc

20

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

<400> 20
catgatcgct gaaccga

17

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

<400> 21
catgatcgct gaaccgagga

20

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

<400> 22
aggagtgtgg tgcgtctgga

20

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

<400> 23
cttcagggtgt acgtgttcg

19

<210> 24
<211> 18

WO 01/12821

05.03.02

PCT/IB00/01017

<212> DNA

<213> *Streptomyces avermitilis*

<400> 24

gaactggtac cagtgcc

18

<210> 25

<211> 46

<212> DNA

<213> *Streptomyces avermitilis*

<400> 25

gggggcgggc ccgggtgcgg aggcggaaat gccgctggcg acgttc

46