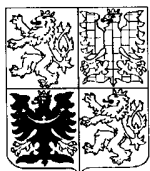


PŘIHLÁŠKA VYNÁLEZU

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

(19)
ČESKÁ
REPUBLIKA



ÚŘAD
PRŮMYSLOVÉHO
VLASTNICTVÍ

(22) Přihlášeno: **25.01.1999**

(32) Datum podání prioritní přihlášky: **13.02.1998**

(31) Číslo prioritní přihlášky: **1998/074636**

(33) Země priority: **US**

(40) Datum zveřejnění přihlášky vynálezu: **15.11.2000**
(Věstník č. 11/2000)

(86) PCT číslo: **PCT/IB99/00130**

(87) PCT číslo zveřejnění: **WO99/41389**

(21) Číslo dokumentu:

2000 - 2794

(13) Druh dokumentu: **A3**

(51) Int. Cl. ⁷:

C 12 N 15/60

C 12 N 15/52

C 12 N 9/88

C 12 N 15/76

C 12 P 19/62

C 12 P 17/18

C 12 Q 1/527

C 12 N 1/21

//(C 12 N 1/21, C 12 R 1:465)

(71) Přihlašovatel:

PFIZER PRODUCTS INC., Groton, CT, US;

(72) Původce:

Stutzman-Engwall Kim Jonelle, East Lyme, CT, US;

Katoh Yoshihiro, Handa-shi, JP;

McArthur Hamish Alastair Irvine, Gales Ferry, CT, US;

(74) Zástupce:

Matějka Jan JUDr., Národní 32, Praha 1, 11000;

(54) Název přihlášky vynálezu:

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

(57) Anotace:

Řešení se týká polynukleotidových molekul obsahujících nukleotidové sekvence kódující aveC genový produkt, kde tyto polynukleotidové molekuly mohou být použity pro změnu poměru nebo množství avermektinů třídy 2 a třídy 1, produkovaných ve fermentačních kulturách *S. avermitilis*. Dále se týká vektorů, hostitelských buněk a mutantních kmenů *S. avermitilis*, ve kterých byl aveC gen inaktivován nebo mutován tak, že mění poměr B2 : B1 produkovaných avermektinů.

1 29.08.00

PV2070-2794

60954

Gen *Streptomyces avermitilis* řídící poměr B2:B1 avermektinů

Oblast techniky

Předkládaný vynález se týká prostředků a způsobů pro produkci avermektinů a spadá primárně do oblasti zdraví živočichů. Přesněji se předkládaný vynález týká polynukleotidových molekul obsahujících nukleotidové sekvence kódující produkt AveC genu, které mohou být použity pro ovlivnění poměru avermektinů třídy 2 a 1, které jsou produkovány fermentací kultur *Streptomyces avermitilis*, a prostředků a způsobů pro vyhledávání takových polynukleotidových molekul. Předkládaný vynález se dále týká vektorů, transformovaných hostitelských buněk a nových mutantních kmenů *S. avermitilis*, ve kterých byl aveC gen mutován tak, aby ovlivňoval poměr produkováných avermektinů třídy 2 a 1.

Dosavadní stav techniky

Avermektiny

Druhy *Streptomyces* produkují velké množství sekundárních metabolitů, včetně avermektinů, které jsou tvořeny serií osmi podobných šestnáctičlenných makrocyclických laktonů, které mají silnou antihelmintickou a insekticidní aktivitu. 8 odlišných, ale blízce příbuzných sloučenin, je označováno jako A1a, A1b, A2a, A2b, B1a, B1b, B2a a B2b. "a" serie sloučenin označuje přirozené avermektiny, ve kterých je substituentem v C25 pozici (S)-sekundární butyl, a "b" označuje ty sloučeniny, ve kterých je substituentem v C25 pozici isopropyl. Označení "A" a "B" označuje avermektiny, ve kterých je substituent v C5 pozici methoxy- a hydroxy-skupina, v příslušném pořadí. Číslice "1"

označuje avermektiny, které obsahují dvoujnou vazbu v pozici C22,23 a číslice "2" označuje avermektiny, které obsahují vodík v pozici C22 a hydroxy-skupinu v pozici C23. Z příbuzných avermektinů má avermektin typu B1 nejúčinnější antiparasitární a pesticidní aktivitu a je proto komerčně nejžádanějším avermektinem.

Avermektiny a jejich produkce aerobní fermentací kmenů *S. avermitilis* jsou popsány v U.S. patentech 4310519 a 4429042. Předpokládá se, že biosyntéza přirozených avermektinů je iniciována endogenně z CoA thioesterových analogů kyseliny isomáselné a kyseliny S-(+)-2-methylmáselné.

Kombinací úprav kmenů náhodnou mutagenesí a použití exogenně dodávaných mastných kyselin vedla k zlepšení produkce analogů avermektinů. Mutanty *S. avermitilis*, které jsou deficientní v dehydrogenase rozvětvených 2-oxo kyselin (bkd deficientní mutanty) mohou produkovat avermektiny pouze tehdy, jsou-li fermentace doplňovány mastnými kyselinami. Vyhledávání a izolace mutantů deficientních v dehydrogenasové aktivitě pro rozvětvené řetězce (například *S. avermitilis* ATCC 53567) jsou popsány v Evropské patentové přihlášce (EP) 276103. Fermentace takových mutantů v přítomnosti exogenně dodávaných mastných kyselin vede k produkci pouze čtyř avermektinů, které odpovídají použitým mastným kyselinám. Tak vede doplňování fermentace *S. avermitilis* (ATCC 53567) kyselinou S-(+)-2-methylmáselnou k produkci přirozených avermektinů A1a, A2a, B1a a B2a; doplňování fermentace kyselinou isomáselnou k produkci přirozených avermektinů A1b, A2b, B1b a B2b; a doplňování fermentace kyselinou cyklopentankarboxylovou k produkci čtyř nových cyklopentylavermektinů A1, A2, B1 a B2.

Když jsou dodávány jiné mastné kyseliny, tak jsou produkovány nové avermektiny. Při testování více než 800 potenciálních prekursorů bylo identifikováno více než 60 nových avermektinů (viz například Dutton et al., 1991, J. Antibiot. 44: 357-365; a Banks et al., 1994, Roy. Soc. Chem. 147: 16-26). Dále, mutanty *S. avermitilis* deficientní v 5-O-methyltransferasové aktivitě produkují v podstatě pouze B analogy avermektinů. V důsledku toho produkují mutanty deficientní jak v dehydrogenasové aktivitě pro rozvětvené 2-oxo kyseliny, tak v 5-O-methyltransferasové aktivitě, pouze B avermektiny odpovídající mastným kyselinám použitým pro doplňování fermentace. Tak vede dodávání kyseliny S-(+)-2-methylmáselné k takových dvojitém mutantům k produkci pouze přirozených avermektinů B1a a B2a, zatímco dodávání kyseliny isomáselné a kyseliny cyklopentankarboxylové vede k produkci přirozených avermektinů B1b a B2b nebo nových cyklopentylových B1 a B2 avermektinů, v příslušném pořadí. Dodávání kyseliny cyklopentankarboxylové k takovým dvojitém mutantům je výhodnou metodou pro produkci komerčně významného nového avermektinu, cyklohexylavermektinu B1 (doramektinu). Izolování a charakteristiky takových dvojitých mutantů, například *S. avermitilis* (ATCC 53692), jsou popsány v EP 276103.

Geny účastníci se biosyntézy avermektinů

V mnoha případech jsou geny účastníci se na produkci sekundárních metabolitů a geny kódující určitá antibiotika přítomné v seskupení na chromosomu. Tak je tomu například v případě *Streptomyces* genového seskupení polyketid-synthasy (PKS) (viz Hopwood and Sherman, 1990, Ann. Rev. Genet. 24: 37-66). Proto je jednou strategií pro klonování genů v biosyntetické dráze izolování genu pro resistenci na léky a potom testování sousedních regionů chromosomu na jiné geny

související s biosyntézou určitého antibiotika. Jinou strategií pro klonování genů účastnících se biosyntézy významných metabolitů je komplementace mutantů. Například, části DNA knihovny z organismů schopných produkce určitého metabolitu jsou vkládány do mutantů neprodukujících tento metabolit a transformanty jsou vyšetřovány na produkci metabolitu. Dále byla pro identifikaci a klonování genů v biosyntetické dráze použita hybridizace knihovny sondami z rodu *Streptomyces*.

Geny účastnící se v biosyntéze avermektinů (ave geny), podobně jako geny nutné pro biosyntézu jiných sekundárních metabolitů *Streptomyces* (například PKS), se nacházejí v genovém seskupení na chromosomu. Mnoho ave genů bylo úspěšně klonováno za použití vektorů doplňujících mutanty *S. avermitilis* s blokovanou biosyntézou avermektinů. Klonování takových genů je popsáno v U.S. patentu 5252474. Kromě toho, Ikada et al., 1995, J. Antibiot. 48: 532-534, popisují lokalizaci chromosomálního regionu nutného pro stupeň dehydrogenace C22,23 (aveC) na 4,82 kb BamHI fragment *S. avermitilis*, stejně jako popisují mutace v aveC genu, které vedou ke vzniku mutantu produkujícího pouze B2a. Protože ivermektin, účinná antihelmintická sloučenina, může být produkován chemicky z avermektinu B2a, jsou takové kmeny produkující pouze avermektin B2a významné pro komerční produkci ivermektinu.

Identifikace mutací v aveC genu, které minimalizují komplexnost produkce avermektinů, jako jsou například mutace snižující poměr avermektinů B2:B1, zjednoduší produkci a přečištění komerčně významných avermektinů.

Podstata vynálezu

Předkládaný vynález obsahuje izolovanou polynukleotidovou molekulu obsahující kompletní aveC ORF *S. avermitilis* nebo jeho významnou část, kde tato izolovaná polynukleotidová molekula neobsahuje další kompletní ORF, který je in situ v chromosomu *S. avermitilis* umístěn za aveC ORF. Izolovaná polynukleotidová molekula podle předkládaného vynálezu výhodně obsahuje nukleotidovou sekvenci, která je stejná jako sekvence kódující AveC genový produkt *S. avermitilis* v plasmidu pSE186 (ATCC 209604), nebo je stejná, jako nukleotidová sekvence aveC ORF podle obr. 1 (SEQ ID NO: 1) nebo její významná část.

Předkládaný vynález dále obsahuje polynukleotidovou molekulu obsahující nukleotidovou sekvenci, která je homologní k sekvenci kódující AveC genový produkt *S. avermitilis* v plasmidu pSE186 (ATCC 209604), nebo k nukleotidové sekvenci aveC ORF podle obr. 1 (SEQ ID NO: 1) nebo její významné části.

Předkládaný vynález dále obsahuje polynukleotidovou molekulu obsahující nukleotidovou sekvenci, která kóduje polypeptid mající aminokyselinovou sekvenci, která je homologní k aminokyselinové sekvenci kodované kódující sekvencí pro AveC genový produkt *S. avermitilis* v plasmidu pSE186 (ATCC 209604), nebo k aminokyselinové sekvenci podle obr. 1 (SEQ ID NO: 2) nebo její významné části.

Předkládaný vynález dále obsahuje izolovanou polynukleotidovou molekulu obsahující nukleotidovou sekvenci kódující AveC produkt homologního genu. Ve výhodném provedení obsahuje izolovaná polynukleotidová molekula nukleotidovou sekvenci kódující AveC produkt homologního genu z *S. hygroscopicus*, kde produkt homologního genu obsahuje

aminokyselinovou sekvenci SEQ ID NO: 4 nebo její významnou část. Ve výhodném provedení obsahuje izolovaná polynukleotidová molekula podle předkládaného vynálezu, která kóduje AveC produkt homologního genu *S. hygroscopicus*, nukleotidovou sekvenci SEQ ID NO: 3 nebo její významnou část.

Předkládaný vynález dále obsahuje polynukleotidovou molekulu obsahující nukleotidovou sekvenci, která je homologní s nukleotidovou sekvencí SEQ ID NO: 3 *S. hygroscopicus*. Předkládaný vynález dále obsahuje polynukleotidovou molekulu obsahující nukleotidovou sekvenci, která kóduje polypeptid, který je homologní k AveC produktu homologního genu *S. hygroscopicus*, který má aminokyselinovou sekvenci SEQ ID NO: 4.

Předkládaný vynález dále obsahuje oligonukleotidy, které hybridizují na polynukleotidovou molekulu obsahující nukleotidovou sekvenci podle obr. 1 (SEQ ID NO: 1) nebo SEQ ID NO: 3, nebo na polynukleotidovou molekulu obsahující nukleotidovou sekvenci, která je komplementární k nukleotidové sekvenci podle obr. 1 (SEQ ID NO: 1) nebo k SEQ ID NO: 3.

Předkládaný vynález dále obsahuje rekombinantní klonovací vektory a expresní vektory, které jsou použitelné pro klonování a expresi polynukleotidu podle předkládaného vynálezu, včetně polynukleotidových molekul obsahujících aveC ORF *S. avermitilis* nebo aveC homolog ORF. V příkladném provedení obsahuje předkládaný vynález plasmid pSE186 (ATCC 209604), který obsahuje celý ORF aveC genu *S. avermitilis*. Předkládaný vynález dále obsahuje transformované hostitelské buňky obsahující polynukleotidovou molekulu nebo rekombinantní vektor podle předkládaného vynálezu a nové kmeny nebo buněčné linie odvozené od těchto buněk.

Předkládaný vynález dále obsahuje rekombinantně produkováný produkt AveC genu nebo produkt homologického AveC genu nebo jeho významnou část, který byl významně přečištěn a izolován, stejně jako homology těchto produktů. Předkládaný vynález dále obsahuje způsob pro produkci rekombinantního produktu AveC genu, který obsahuje kultivaci hostitelské buňky transformované rekombinantním expresním vektorem, kde uvedený rekombinantní expresní vektor obsahuje polynukleotidovou molekulu obsahující nukleotidovou sekvenci kódující produkt AveC genu nebo produkt AveC homologického genu, kde tato polynukleotidová molekula je operativně navázaná na jeden nebo více regulačních elementů, které kontrolují expresi polynukleotidové molekuly v hostitelské buňce, kde tato kultivace je provedena za podmínek umožňujících produkci rekombinantního produktu AveC genu nebo AveC homologického genu, a získání produktu AveC genu nebo produktu homologického AveC genu z buněčné kultury.

Předkládaný vynález dále obsahuje polynukleotidovou molekulu obsahující nukleotidovou sekvenci, která je jinak stejná, jako sekvence kódující produkt AveC genu *S. avermitilis* v plasmidu pSE186 (ATCC 209604) nebo nukleotidová sekvence *aveC* ORF *S. avermitilis*, jak je uvedena na obr. 1 (SEQ ID NO: 1), ale která dále obsahuje jednu nebo více mutací, které způsobí, že buňky *S. avermitilis* kmene ATCC 53692, ve kterých byla přirozená *aveC* alela inaktivována a které exprimují polynukleotidovou molekulu obsahující mutovanou nukleotidovou sekvenci, produkuje jiný poměr nebo množství avermektinů, než který je produkován buňkami *S. avermitilis* kmene ATCC 53692, které exprimují pouze přirozenou *aveC* alelu. Podle předkládaného vynálezu mohou být takové polynukleotidové molekuly použity pro přípravu nových kmenů *S. avermitilis*, které vykazují detekovatelné změny v produkci avermektinů ve srovnání se stejnými kmeny, které exprimují pouze přirozenou *aveC* alelu. Ve výhodném provedení

jsou takové polynukleotidové molekuly použitelné pro produkci nových kmenů *S. avermitilis*, které produkují avermektiny ve sníženém poměru třídy 2 ku třídě 1, ve srovnání se stejnými kmeny, které exprimují pouze přirozenou *aveC* alelu. V dalším výhodném provedení jsou takové polynukleotidové molekuly použitelné pro produkci nových kmenů *S. avermitilis*, které produkují vyšší množství avermektinů ve srovnání se stejnými kmeny, které exprimují pouze přirozenou *aveC* alelu. V ještě dalším výhodném provedení jsou takové polynukleotidové molekuly výhodné pro přípravu nových kmenů *S. avermitilis*, ve kterých je *aveC* gen inaktivován.

Předkládaný vynález obsahuje způsoby pro identifikaci mutací *aveC* ORF *S. avermitilis*, které mění poměr a/nebo množství produkovaných avermektinů. Ve výhodném provedení obsahuje předkládaný vynález způsob pro identifikaci mutací *aveC* ORF, které mění poměr produkovaných avermektinů třídy 2:1, který obsahuje: (a) stanovení poměrů produkovaných avermektinů třídy 2:třídě 1 pro kmen *S. avermitilis*, ve kterém byla inaktivována přirozená *aveC* alela, a do kterého byla vložena a ve kterém je exprimována polynukleotidová molekula obsahující nukleotidovou sekvenci kódující mutovaný produkt *aveC* genu; (b) stanovení poměrů produkovaných avermektinů třídy 2:třídě 1 pro stejný kmen *S. avermitilis* jako v kroku (a), který však exprimuje pouze *aveC* alelu obsahující nukleotidovou sekvenci ORF podle obr. 1 (SEQ ID NO: 1) nebo nukleotidovou sekvenci, která je homologní k této sekvenci; a (c) srovnání poměru avermektinů třídy 2:třídě 1 produkovaných buňkami *S. avermitilis* z kroku (a) s poměrem avermektinů třídy 2:třídě 1 produkovaných buňkami *S. avermitilis* z kroku (b); takže pokud se poměr avermektinů třídy 2:třídě 1 produkovaných buňkami *S. avermitilis* z kroku (a) liší od poměru avermektinů třídy 2:třídě 1 produkovaných buňkami *S. avermitilis* z kroku (b), tak byla identifikována

mutace aveC ORF schopná měnit poměr avermektinů třídy 2:třídě 1. Ve výhodném provedení je poměr avermektinů třídy 2:třídě 1 snížen v důsledku mutace.

V dalším výhodném provedení obsahuje předkládaný vynález způsob pro identifikaci mutací aveC ORF nebo genetických konstruktů obsahujících aveC ORF, které mění množství produkovaných avermektinů, který obsahuje: (a) stanovení množství avermektinů produkovaných buňkami kmene *S. avermitilis*, ve kterém byla inaktivována přirozená aveC alela, a do kterého byla vložena a ve kterém je exprimována polynukleotidová molekula obsahující nukleotidovou sekvenci kódující mutovaný produkt aveC genu nebo obsahující genetický konstrukt obsahující nukleotidovou sekvenci kódující AveC genový produkt; (b) stanovení množství avermektinů produkovaných stejným kmenem *S. avermitilis* jako v kroku (a), který však exprimuje pouze aveC alelu obsahující nukleotidovou sekvenci ORF podle obr. 1 (SEQ ID NO: 1) nebo nukleotidovou sekvenci, která je homologní k této sekvenci; a (c) srovnání množství avermektinů produkovaných buňkami *S. avermitilis* z kroku (a) s množství avermektinů produkovaných buňkami *S. avermitilis* z kroku (b); takže pokud se množství avermektinů produkovaných buňkami *S. avermitilis* z kroku (a) liší od množství avermektinů produkovaných buňkami *S. avermitilis* z kroku (b), tak byla identifikována mutace aveC ORF nebo genetický konstrukt, které jsou schopné měnit množství avermektinů. Ve výhodném provedení je množství produkovaných avermektinů zvýšeno v důsledku mutace.

Předkládaný vynález dále obsahuje rekombinantní vektory, které jsou použitelné pro přípravu nových kmenů *S. avermitilis*, které mají změněnou produkci avermektinů. Například, předkládaný vynález obsahuje vektory, které mohou být použity

pro cílené vložení jakékoliv polynukleotidové molekuly obsahující mutované nukleotidové sekvence podle předkládaného vynálezu do místa aveC genu na chromosomu *S. avermitilis*, kde tyto polynukleotidy jsou použity pro inserci nebo nahrazení aveC ORF nebo jeho části pomocí homologní rekombinace. Nicméně, podle předkládaného vynálezu může polynukleotidová molekula obsahující mutovanou nukleotidovou sekvenci podle předkládaného vynálezu také modulovat biosyntézu avermektinů tehdy, je-li insertována do chromosomu *S. avermitilis* v místě jiném než v aveC genu, nebo pokud je v buňkách *S. avermitilis* přítomná episomálně. Tak obsahuje předkládaný vynález také vektory obsahující polynukleotidovou molekulu obsahující mutovanou nukleotidovou sekvenci podle předkládaného vynálezu, které mohou být použity pro inserci polynukleotidové molekuly v jiném místě chromosomu *S. avermitilis* než v aveC genu, nebo pro episomální lokalizaci. Ve výhodném provedení obsahuje předkládaný vynález vektory pro nahrazování genů, které mohou být použity pro inserci mutované aveC alely do chromosomu *S. avermitilis* pro přípravu nových buněčných kmenů, které produkují avermektiny se sníženým poměrem třídy 2:třídě 1 ve srovnání s buňkami stejného kmenu, které exprimují pouze přirozenou aveC alelu.

Předkládaný vynález dále obsahuje způsoby pro přípravu nových kmenů *S. avermitilis*, které jsou tvořeny buňkami, které exprimují mutovanou aveC alelu a které produkují pozměněné poměry a/nebo množství avermektinů ve srovnání s buňkami stejného kmene *S. avermitilis*, který exprimuje pouze přirozenou aveC alelu. Ve výhodném provedení obsahuje předkládaný vynález způsob pro přípravu nových kmenů *S. avermitilis*, které jsou tvořeny buňkami, které exprimují mutovanou aveC alelu a které produkují pozměněné poměry avermektinů třídy 2:třídě 1 ve srovnání s buňkami stejného kmene *S. avermitilis*, který

exprimuje pouze přirozenou aveC alelu, kde uvedený způsob obsahuje transformaci buněk kmene *S. avermitilis* vektorem, který nese mutovanou aveC alelu, která kóduje genový produkt, který mění poměr avermektinů třídy 2:třídě 1 produkovaných buňkami kmene *S. avermitilis* exprimujícími mutovanou alelu ve srovnání s buňkami stejného kmene *S. avermitilis*, které exprimují pouze přirozenou aveC alelu; a selekci transformovaných buněk, které produkují avermektiny v pozměněném poměru třídy 2:třídě 1 ve srovnání s poměrem třídy 2:třídě 1, který je produkován buňkami exprimujícími pouze přirozenou aveC alelu. Ve výhodném provedení je v buňkách nového kmene poměr produkovaných avermektinů třídy 2:třídě 1 snížen.

V jiném výhodném provedení obsahuje předkládaný vynález způsob pro přípravu nových kmenů *S. avermitilis*, které jsou tvořeny buňkami, které produkují pozměněná množství avermektinů, který obsahuje transformaci buněk kmene *S. avermitilis* vektorem, který nese mutovanou aveC alelu nebo genetický konstrukt obsahující aveC alelu, jehož exprese vede k produkci pozměněného množství avermektinů produkovaných buňkami kmene *S. avermitilis* exprimujícími mutovanou aveC alelu nebo genetický konstrukt ve srovnání s buňkami stejného kmene *S. avermitilis*, které exprimují pouze přirozenou aveC alelu; a selekci transformovaných buněk, které produkují avermektiny v pozměněném množství ve srovnání množstvím avermektinů, které je produkováno buňkami exprimujícími pouze přirozenou aveC alelu. Ve výhodném provedení je v buňkách nového kmene produkováno větší množství avermektinů.

V dalším výhodném provedení obsahuje předkládaný vynález způsob přípravy nových kmenů *S. avermitilis*, kde buňky těchto kmenů obsahují inaktivovanou aveC alelu, kde uvedený způsob obsahuje transformaci buněk *S. avermitilis*, které exprimují

přirozenou aveC alelu, vektorem, který inaktivuje aveC alelu; a selekci transformovaných buněk, ve kterých byla aveC alela inaktivována.

Předkládaný vynález dále obsahuje nové kmeny *S. avermitilis* tvořené buňkami, které byly transformovány jakoukoliv polynukleotidovou molekulou nebo vektorem obsahujícím mutovanou nukleotidovou sekvenci podle předkládaného vynálezu. Ve výhodném provedení obsahuje předkládaný vynález nové kmeny *S. avermitilis* tvořené buňkami, které exprimují mutovanou aveC alelu místo, nebo současně s přirozenou aveC alelou, kde tyto buňky nového kmene produkují avermektiny v pozměněném poměru třídy 2:třídě 1 ve srovnání s buňkami stejného kmene, které exprimují pouze přirozenou aveC alelu. Ve výhodnějším provedení produkují buňky nového kmene avermektiny ve sníženém poměru třídy 2:třídě 1 ve srovnání s buňkami stejného kmene, které exprimují pouze přirozenou aveC alelu. Takové nové kmeny jsou užitečné pro průmyslovou produkci komerčně žádoucích avermektinů, jako je doramektin.

V dalším výhodném provedení obsahuje předkládaný vynález nové kmeny *S. avermitilis* tvořené buňkami, které exprimují mutovanou aveC alelu nebo genetický konstrukt obsahující aveC alelu místo, nebo současně s, přirozenou aveC alelou, což vede k produkci jiných množství avermektinů ve srovnání s množstvím avermektinů produkovaných buňkami stejného kmene, které exprimují pouze přirozenou aveC alelu. Ve výhodném provedení produkují buňky nového kmene avermektiny ve vyšším množství.

V ještě dalším výhodném provedení obsahuje předkládaný vynález nové kmeny *S. avermitilis* tvořené buňkami, ve kterých byl aveC gen inaktivován. Takové kmeny jsou užitečné jak z hlediska odlišného spektra produkovaných avermektinů ve

srovnání s přirozenými kmeny, tak pro komplementační vyhledávací testy, jak jsou zde popsány, pro stanovení toho, zda cílená nebo náhodná mutagenese *aveC* genů ovlivňuje produkci avermektinů.

Předkládaný vynález dále obsahuje způsob pro produkci avermektinů, který obsahuje kultivaci buněk kmene *S. avermitilis*, které exprimují mutovanou *aveC* alelu, která kóduje genový produkt, který mění poměr avermektinů třídy 2:třídy 1 produkovaných buňkami kmene *S. avermitilis* exprimujícími mutovanou *aveC* alelu ve srovnání s buňkami stejného kmene neexprimujícími mutovanou *aveC* alelu, ale pouze přirozenou *aveC* alelu, v kultivačním mediu za podmínek umožňujících nebo indukujících produkci avermektinů; a získání uvedených avermektinů z kultury. Ve výhodném provedení je poměr avermektinů třídy 2:třídy 1 produkovaných buňkami exprimujícími mutaci snížen. Tento způsob umožňuje dosažení vyšší účinnosti produkce komerčně hodnotných avermektinů, jako je doramektin.

Předkládaný vynález dále obsahuje způsob pro produkci avermektinů, který obsahuje kultivaci buněk kmene *S. avermitilis*, které exprimují mutovanou *aveC* alelu nebo genetický konstrukt obsahující *aveC* alelu, kde tato kultivace vede k produkci pozměněných množství avermektinů produkovaných buňkami kmene *S. avermitilis* exprimujícími mutovanou *aveC* alelu nebo genetický konstrukt ve srovnání s buňkami stejného kmene neexprimujícími mutovanou *aveC* alelu ani genetický konstrukt, ale pouze přirozenou *aveC* alelu, v kultivačním mediu za podmínek umožňujících nebo indukujících produkci avermektinů; a získání uvedených avermektinů z kultury. Ve výhodném provedení je množství avermektinů produkovaných buňkami exprimujícími mutaci nebo genetický konstrukt zvýšeno.

Předkládaný vynález dále obsahuje nové prostředky obsahující avermektiny produkované kmeny *S. avermitilis* exprimujícími mutovanou *aveC* alelu podle předkládaného vynálezu, kde tyto avermektiny jsou produkovány ve sníženém poměru třídy 2:třídy 1 ve srovnání s buňkami stejného kmene neexprimujícími mutovanou *aveC* alelu, ale pouze přirozenou *aveC* alelu. Nové prostředky obsahující avermektin mohou být ve formě produkované ve fermentační kultivační kapalině, nebo mohou být získány z této kapaliny a částečně nebo významně přečištěny z této kapaliny.

Popis obrázků na připojených výkresech

Obr. 1: DNA sekvence (SEQ ID NO: 1) obsahující *S. avermitilis* *aveC* ORF a odvozená aminokyselinová sekvence (SEQ ID NO: 2).

Obr. 2: Plasmidový vektor pSE186 (ATCC 209604) obsahující celý ORF *aveC* genu *S. avermitilis*.

Obr. 3: Genový substituční vektor pSE180 (ATCC 209605) obsahující *ermE* gen *Sacc. erythraea* insertovaný do *aveC* ORF *S. avermitilis*.

Obr. 4: BamHI restriční mapa genové seskupení avermektin-synthasového genu z *S. avermitilis* s pěti identifikovaným překrývajícími se kosmidovými klony (t.j. pSE65, pSE66, pSE67, pSE68, pSE69). Také je vyznačen vztah pSE118 a pSE119.

Obr. 5: HPLC analýza fermentačních produktů produkovaných kmeny *S. avermitilis*. Kvantifikace píku byla provedena srovnáním se standardními množstvími cyklohexyl-B1. Retenční čas cyklohexyl-B2 byl 7,4-7,7 min.; retenční čas cyklohexyl-B1 byl 11,9-12,3 min. Obr. 5A: Kmen SE180-11 *S. avermitilis* s inaktivovaným *aveC* ORF. Obr. 5B: Kmen SE180-11 *S. avermitilis* transformovaný pSE186

(ATCC 209604). Obr. 5C: Kmen SE180-11 *S. avermitilis* transformovaný pSE187. Obr. 5D: Kmen SE180-11 *S. avermitilis* transformovaný pSE188.

Obr. 6: Srovnání odvozené aminokyselinové sekvence kodované aveC ORF *S. avermitilis* (SEQ ID NO: 2), částečného ORF aveC homologu z *S. griseochromogenes* (SEQ ID NO: 5) a ORF aveC homologu z *S. hygroscopicus* (SEQ ID NO: 4). Valinový zbytek uvedený tučným písmem je předpokládané start-místo pro protein. Konzervované zbytky jsou uvedeny velkými písmeny pro homologii ve všech třech sekvencích a malými písmeny pro homologii ve 2 ze 3 sekvencí. Aminokyselinové sekvence měly přibližně 50% identitu sekvence.

Obr. 7: Hybridní plasmidový konstrukt obsahující 564 bp BsaAI/KpnI fragment z aveC homologického genu *S. hygroscopicus* insertovaný do BsaAI/KpnI místa v *S. avermitilis* avec ORF.

Předkládaný vynález se týká identifikace a charakterizace polynukleotidových molekul obsahujících nukleotidové sekvence, které kódují AveC genový produkt ze *S. avermitilis*, konstrukce nových kmenů *S. avermitilis*, které mohou být použity pro testování mutovaných AveC genových produktů na jejich vliv na produkci avermektinů a zjištění, že některé mutované AveC genové produkty mohou snižovat poměr B2:B1 avermektinů produkovaných *S. avermitilis*. Vynález je dále popsán na příkladu polynukleotidové molekuly obsahující buď nukleotidovou sekvenci, která je stejná jako sekvence kódující AveC genový produkt *S. avermitilis* v plasmidu pSE186 (ATCC 209604), nebo nukleotidovou sekvenci ORF podle obr. 1 (SEQ ID NO: 1), a na příkladu polynukleotidových molekul odvozených od této sekvence obsahující mutované nukleotidové sekvence. Nicméně, principy

uvedené v předkládaném vynálezu mohou být analogicky použity na jiné polynukleotidové molekuly, včetně aveC homologických genů z jiných kmenů *Streptomyces*, včetně například *S. hygroscopicus* a *S. griseochromogenes*.

Polynukleotidové molekuly kódující AveC genový produkt
S. avermitilis

Předkládaný vynález poskytuje izolovanou polynukleotidovou molekulu obsahující kompletní aveC ORF *S. avermitilis* nebo jeho významnou část, kde uvedená izolovaná polynukleotidová molekula neobsahuje další kompletní ORF, který je in situ v chromosomu *S. avermitilis* umístěn po aveC ORF.

Izolovaná polynukleotidová molekula podle předkládaného vynálezu výhodně obsahuje nukleotidovou sekvenci, která je stejná jako sekvence kódující AveC genový produkt *S. avermitilis* v plasmidu pSE186 (ATCC 209604), nebo která je stejná jako nukleotidová sekvence ORF podle obr. 1 (SEQ ID NO: 1) nebo její významná část. Termín "významná část" izolované polynukleotidové molekuly obsahující nukleotidovou sekvenci kódující AveC genový produkt *S. avermitilis*, jak je zde použit, označuje izolovanou polynukleotidovou molekulu obsahující alespoň 70% sekvence kompletního aveC ORF, jak je uvedena na obr. 1 (SEQ ID NO: 1), která kóduje funkčně ekvivalentní AveC genový produkt. Termín "funkčně ekvivalentní" AveC genový produkt je v této souvislosti definován jako genový produkt, který při expresi v *S. avermitilis* kmene ATCC 53692, ve kterém byla inaktivována přirozená alela aveC, vede k produkci v podstatě stejných poměrů a množství avermektinů, jako jsou produkovány v *S. avermitilis* kmene ATCC 53692, který exprimuje pouze přirozenou, funkční aveC alelu přirozenou pro *S. avermitilis* kmen ATCC 53692.

Kromě nukleotidové sekvence aveC ORF může izolovaná polynukleotidová molekula podle předkládaného vynálezu obsahovat nukleotidové sekvence, které za přirozených podmínek sousedí s aveC genem in situ v *S. avermitilis*, jako jsou například sousední nukleotidové sekvence uvedené na obr. 1 (SEQ ID NO: 1).

Termíny "polynukleotidová molekula", "polynukleotidová sekvence", "kódující sekvence", "otevřený čtecí rámec", a "ORF", jak jsou zde použity, označují jak DNA, tak RNA molekuly, které mohou být jednořetězcové nebo dvouřetězcové a které mohou být transkribovány nebo translatovány (DNA) nebo translatovány (RNA) na AveC genový produkt nebo, jak bude uvedeno dále, na AveC homologní genový produkt, nebo na polypeptid, který je homologní k AveC genovému produktu nebo AveC homolognímu genovému produktu, ve vhodném buněčném expresním systému, za použití vhodných regulačních elementů. Kódující sekvence může obsahovat, bez omezení, prokaryotické sekvence, cDNA sekvence, genomové DNA sekvence a chemicky syntetizované DNA a RNA sekvence.

Nukleotidová sekvence uvedená na obr. 1 (SEQ ID NO: 1) obsahuje čtyři různé GTG kodony v pozicích 42, 174, 177 a 180 bp. Jak je uvedeno dále, vícečetné delece 5'-regionu aveC ORF (obráz. 1; SEQ ID NO: 1) byly vytvořeny pro definování toho, které kodony mohou působit v aveC ORF jako start kodony pro expresi proteinu. Delece prvního GTG místa v bp 42 neeliminovala aktivitu AveC. Další delece všech tří GTG kodonů v pozicích 174, 177 a 180 bp dohromady eliminovaly aktivitu AveC, což ukazuje, že tento region je nutný pro expresi proteinu. Předkládaný vynález proto zahrnuje aveC ORF různé délky, které zahajují translaci v jakémkoliv z GTG míst

umístěných v pozicích 174, 177 nebo 180 bp, jak jsou uvedeny na obr. 1 (SEQ ID NO: 1) a příslušné polypeptidy pro každý ORF.

Předkládaný vynález dále poskytuje polynukleotidovou molekulu obsahující nukleotidovou sekvenci, která je homologická k sekvenci kódující AveC genový produkt *S. avermitilis* v plasmidu pSE186 (ATCC 209604), nebo která je homologická k nukleotidové sekvenci aveC ORF podle obr. 1 (SEQ ID NO: 1) nebo její významné části. Termín "homologická" použitý v souvislosti s polynukleotidovou molekulou homologickou ke kódující sekvenci pro AveC genový produkt označuje polynukleotidovou molekulu obsahující nukleotidovou sekvenci: (a) která kóduje stejný AveC genový produkt jako sekvence kódující AveC genový produkt *S. avermitilis* v plasmidu pSE186 (ATCC 209604), nebo která kóduje stejný AveC genový produkt jako nukleotidová sekvence aveC ORF podle obr. 1 (SEQ ID NO: 1), ale která obsahuje jednu nebo více silentních změn nukleotidové sekvence v souladu s degenerací genetického kódu; nebo (b) která hybridizuje na komplementární polynukleotidovou molekulu obsahující nukleotidovou sekvenci, která kóduje aminokyselinovou sekvenci kodovanou sekvencí kódující AveC genový produkt v plasmidu pSE186 (ATCC 209604), nebo která kóduje aminokyselinovou sekvenci podle obr. 1 (SEQ ID NO: 2), za středně přísných podmínek, t.j. za hybridizace na DNA vázanou na filtr v 0,5 M NaHPO₄, 7% dodecylsíranu sodném (SDS), 1 mM EDTA při 65 °C, s proplachy v 0,2 x SSC/0,1% SDS při 42 °C (viz Ausubel et al., (vyd.), 1989, Current Protocols in Molecular Biology, svazek I, Green Publishing Associates, Inc., a John Wiley and Sons, Inc., New York, str. 2.10.3), a která kóduje funkčně ekvivalentní AveC genový produkt, jak byl definován výše. Ve výhodném provedení hybridizuje polynukleotidová molekula na komplementární sekvenci k nukleotidové sekvenci kódující AveC genový produkt v plasmidu

pSE186 (ATCC 209604), nebo na komplementární sekvenci k nukleotidové sekvenci uvedené na obr. 1 (SEQ ID NO: 1) nebo na její významnou část, za podmínek vysoké přísnosti, t.j. za hybridizace na DNA vázanou na filtr v 0,5 M NaHPO₄, 7% dodecylsírany sodném (SDS), 1 mM EDTA při 65 °C, s proplachy v 0,1 x SSC/0,1% SDS při 68 °C (viz Ausubel et al., 1989, výše), a která kóduje funkčně ekvivalentní AveC genový produkt, jak byl definován výše.

Aktivita AveC genového produktu a jeho potenciálních funkčních ekvivalentů může být stanovena pomocí HPLC analýzy produktů fermentace, jak je popsáno v příkladech uvedených dále. Polynukleotidové molekuly obsahující nukleotidové sekvence kódující funkční ekvivalenty AveC genového produktu *S. avermitilis* zahrnují přirozené aveC geny přítomné v jiných kmenech *S. avermitilis*, aveC homologní geny přítomné v jiných druzích *Streptomyces* a mutované aveC alely, ať přirozené, nebo geneticky upravené.

Předkládaný vynález dále poskytuje polynukleotidovou molekulu obsahující nukleotidovou sekvenci kódující polypeptid mající aminokyselinovou sekvenci, která je homologická k aminokyselinové sekvenci kodované sekvencí kódující AveC genový produkt plasmidu pSE186 (ATCC 209604) nebo k aminokyselinové sekvenci podle obr. 1 (SEQ ID NO: 2) nebo její významné části. Termín "významná část" aminokyselinové sekvence podle obr. 1 (SEQ ID NO: 2), jak je zde použit, označuje polypeptid obsahující alespoň 70% aminokyselinové sekvence uvedené na obr. 1 (SEQ ID NO: 2), který tvoří funkčně ekvivalentní AveC genový produkt, jak byl definován výše.

Jak je zde použit v souvislosti s aminokyselinovými sekvencemi, které jsou homologické k aminokyselinové sekvenci

AveC genového produktu *S. avermitilis*, označuje termín "homologický" polypeptid kodovaný sekvencí kódující AveC genový produkt plasmidu pSE186 (ATCC 209604) nebo mající aminokyselinovou sekvenci podle obr. 1 (SEQ ID NO: 2), ve kterém byl jeden nebo více aminokyselinových zbytků konzervativně substituován jiným aminokyselinovým zbytkem tak, že takové konzervativní substituce vedou ke vzniku funkčně ekvivalentního genového produktu, jak byl definován výše. Konzervativní aminokyselinové substituce jsou dobře známy v oboru. Pravidla pro takové substituce jsou uvedena například v Dayhof, M.D., 1978, Nat. Biomed. Res. Found., Washington, D.C., svazek 5, Sup. 3. Přesněji, konzervativní aminokyselinové substituce jsou takové substituce, které probíhají ve skupině aminokyselin, které jsou podobné z hlediska polarit, acidity nebo charakteru vedlejších řetězců. Geneticky kodované aminokyseliny jsou obvykle děleny do čtyřech skupin: (1) acidické = aspartat, glutamat; (2) bazické = lysin, arginin, histidin; (3) nepolární = alanin, valin, leucin, isoleucin, prolin, fenylalanin, methionin, tryptofan; a (4) polární bez náboje = glycin, asparagin, glutamin, cystein, serin, threonin, tyrosin. Fenylalanin, tryptofan a tyrosin jsou také společně označovány jako aromatické aminokyseliny. Jedna nebo více substitucí provedených v určité skupině, například substituce leucinu za isoleucin nebo valin, nebo aspartatu za glutamat, nebo threoninu za serin, nebo jakékoliv jiné aminokyseliny za strukturálně podobnou aminokyselinu, například za aminokyselinu s podobnou aciditou, polaritou, velikostí vedlejších řetězců nebo s kombinovanou podobností těchto charakteristik, nemají obyčejně vliv na funkci peptidu.

Předkládaný vynález dále poskytuje izolovanou polynukleotidovou molekulu obsahující nukleotidovou sekvenci kódující genový produkt homologický k AveC. Termín "genový

produkt homologický k AveC", jak je zde použit, je definován jako genový produkt mající alespoň 50% identitu aminokyselinové sekvence s AveC genovým produktem *S. avermitilis* obsahujícím aminokyselinovou sekvenci kodovanou sekvencí kódující AveC genový produkt plasmidu pSE186 (ATCC 209604) nebo aminokyselinovou sekvenci podle obr. 1 (SEQ ID NO: 2). V příkladném provedení je genový produkt homologický k AveC získán z *S. hygroscopicus* (jak je popsáno v EP přihlášce 0298423; depositum FERM BP-1901) a obsahuje aminokyselinovou sekvenci SEQ ID NO: 4 nebo její významnou část. Termín "významná část" aminokyselinové sekvence podle SEQ ID NO: 4 označuje polypeptid obsahující alespoň 70% aminokyselinové sekvence SEQ ID NO: 4, který tvoří funkčně ekvivalentní genový produkt homologický k AveC. "Funkčně ekvivalentní" genový produkt homologický k AveC je definován jako genový produkt, který při expresi v *S. hygroscopicus* kmenu FERM BP-1901, ve kterém je nativní alela homologická k AveC inaktivovaná, vede k produkci v podstatě stejných množství a poměrů milbemycinů, jako je produkováno v *S. hygroscopicus* kmenu FERM BP-1901 exprimujícím pouze přirozenou, funkční alelu homologickou k AveC, která je přirozená pro *S. hygroscopicus* kmen FERM BP-1901. V příkladném provedení obsahuje izolovaná polynukleotidová molekula podle předkládaného vynálezu, která kóduje *S. hygroscopicus* genový produkt homologický k AveC, nukleotidovou sekvenci SEQ ID NO: 3 nebo její významnou část. Termín "významná část" izolované polynukleotidové molekuly obsahující nukleotidovou sekvenci SEQ ID NO: 3, jak je zde použit, označuje izolovanou polynukleotidovou molekulu obsahující alespoň 70% nukleotidové sekvence uvedené v SEQ ID NO: 3, která kóduje funkčně ekvivalentní genový produkt homologický k AveC, jak byl definován výše.

Předkládaný vynález dále poskytuje polynukleotidovou molekulu obsahující nukleotidovou sekvenci, která je homologická k nukleotidové sekvenci *S. hygroscopicus* uvedené v SEQ ID NO: 3. Termín "homologická" použitý v souvislosti s polynukleotidovou molekulou homologickou ke kódující sekvenci pro *S. hygroscopicus* genový produkt homologický k AveC označuje polynukleotidovou molekulu obsahující nukleotidovou sekvenci:

- (a) která kóduje stejný genový produkt jako nukleotidová sekvence SEQ ID NO: 3 nebo její významná část, ale která obsahuje jednu nebo více silentních změn nukleotidové sekvence v souladu s degenerací genetického kódu; nebo (b) která hybridizuje na komplementární polynukleotidovou molekulu obsahující nukleotidovou sekvenci, která kóduje aminokyselinovou sekvenci SEQ ID NO: 4, za středně přísných podmínek, t.j. za hybridizace na DNA vázanou na filtr v 0,5 M NaHPO_4 , 7% dodecylsíranu sodném (SDS), 1 mM EDTA při 65 °C, s proplachy v 0,2 x SSC/0,1% SDS při 42 °C (viz Ausubel et al., výše), a která kóduje funkčně ekvivalentní genový produkt homologický k AveC, jak byl definován výše. Ve výhodném provedení hybridizuje polynukleotidová molekula na komplementární sekvenci k nukleotidové sekvenci SEQ ID NO: 3 kódující genový produkt homologický k AveC nebo na její významnou část, za podmínek vysoké přísnosti, t.j. za hybridizace na DNA vázanou na filtr v 0,5 M NaHPO_4 , 7% dodecylsíranu sodném (SDS), 1 mM EDTA při 65 °C, s proplachy v 0,1 x SSC/0,1% SDS při 68 °C (viz Ausubel et al., 1989, výše), a která kóduje funkčně ekvivalentní AveC genový produkt, jak byl definován výše.

Předkládaný vynález dále poskytuje polynukleotidovou molekulu obsahující nukleotidovou sekvenci kódující polypeptid, který je homologický ke genovému produktu *S. hygroscopicus* homologickému k AveC. Jak je zde použit v souvislosti s

polypeptidy, které jsou homologické ke genového produktu homologickému k AveC sekvence SEQ ID NO: 4 z *S.hygroscopicus*, označuje termín "homologický" polypeptid mající aminokyselinovou sekvenci podle SEQ ID NO: 4, ve kterém byl jeden nebo více aminokyselinových zbytků konzervativně substituován jiným aminokyselinovým zbytkem tak, že takové konzervativní substituce vedou ke vzniku funkčně ekvivalentního genového produktu, jak byl definován výše.

Předkládaný vynález dále poskytuje oligonukleotidy, které hybridizují na polynukleotidovou molekulu obsahující nukleotidovou sekvenci podle obr. 1 (SEQ ID NO: 1) nebo SEQ ID NO: 3, nebo na polynukleotidovou molekulu obsahující nukleotidovou sekvenci, která je komplementární k nukleotidové sekvenci podle obr.1 (SEQ ID NO: 1) nebo SEQ ID NO: 3. Takové oligonukleotidy mají délku alespoň přibližně 10 nukleotidů, lépe 15 až 30 nukleotidů, a hybridizují na jednu z výše uvedených polynukleotidových molekul za podmínem vysoké přísnosti, t.j. za výplachů v 6xSSC/0,5% pyrofosforečnan sodný při přibližně 37 °C pro oligonukleotidy délky 14 bazí, přibližně 48 °C pro oligonukleotidy délky 17 bazí, při přibližně 55 °C pro oligonukleotidy délky 20 bazí a při přibližně 60 °C pro oligonukleotidy délky 23 bazí. Ve výhodném provedení jsou oligonukleotidy komplementární k části jedné z výše uvedených polynukleotidových molekul. Tyto oligonukleotidy jsou použitelné pro různé účely, včetně kodování nebo působení jako protismyslné molekuly použitelné v genové regulaci, nebo jako primery pro amplifikaci polynukleotidových molekul kódujících AveC nebo AveC homology.

Další geny homologické k aveC mohou být identifikovány v dalších druzích nebo kmenech *Streptomyces* za použití polynukleotidových molekul nebo oligonukleotidů popsaných v

předkládaném vynálezu a známých technik. Například, oligonukleotidová molekula obsahující část *S. avermitilis* nukleotidové sekvence podle obr. 1 (SEQ ID NO: 1) nebo část *S. hygroscopicus* nukleotidové sekvence SEQ ID NO: 3, může být detekovatelně značena a použita pro prohledávání genetické knihovny konstruované z DNA získané z organismu, který je předmětem zájmu. Přísnost hybridizačních podmínek je vybrána podle vztahu referenčního organismu, v tomto případě *S. avermitilis* nebo *S. hygroscopicus*, ke zkoumanému organismu. Požadavky na různé podmínky přísnosti jsou dobře známy odborníkům v oboru, a takové podmínky budou pravděpodobně záviset na specifickém organismu, ze kterého je získána knihovna a značené sekvence. Takové oligonukleotidy mají délku alespoň 15 nukleotidů a patří mezi ně například oligonukleotidy popsané v následujících příkladech. Amplifikace homologických genů může být provedena za použití těchto a jiných oligonukleotidů a standardních technik, jako je polymerasová řetězová reakce (PCR), ačkoliv jiné amplifikační techniky známe v oboru, jako je například ligasová řetězová reakce, mohou být také použity.

Klony identifikované jako klony obsahující nukleotidové sekvence homologické k *aveC* mohou být testovány na schopnost kodovat funkční genový produkt homologický k *AveC*. Pro tento účel mohou být klony podrobeny analýze sekvence, pomocí které se identifikují vhodné čtecí rámce, stejně jako iniciační a terminační signály. Alternativně nebo kromě toho mohou být klonované DNA sekvence insertovány do vhodného expresního vektoru, t.j. do vektoru, který obsahuje nutné elementy pro transkripci a translaci insertované kódující sekvence pro protein. Může být použit jakýkoliv z mnoha systémů vektor/hostitel, včetně bakteriálních systémů, jako jsou plasmidové, bakteriofágové nebo kosmidové expresní vektory.

Vhodné hostitelské buňky transformované takovými vektory obsahujícími potenciální aveC homologické kódující sekvenec mohou být potom analyzovány na aktivitu AveC typu za použití metod jako je HPLC analýza fermentačních produktů, jak je popsána, například, dále.

Produkce a zpracování polynukleotidových molekul podle předkládaného vynálezu jsou známé v oboru a mohou být provedeny za použití rekombinantních technik, které jsou popsány například v Maniatis et al., 1989, Molecular Cloning, A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY; Ausubel et al., 1989, Current Protocols in Molecular Biology, Greene Publishing Associates and Wiley Interscience, NY; Sambrook et al., 1989, Molecular Cloning, A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY; Innis et al., (ed.), 1995, PCR Strategies, Academic Press, Inc., San Diego; a Erlich (ed.), 1992, PCR Technology, Oxford University Press, New York, které jsou zde všechny uvedeny jako odkazy. Polynukleotidové klony kódující AveC genové produkty nebo genové produkty homologické k AveC mohou být identifikovány za použití jakékoliv metody známé v oboru, jako jsou například metody uvedené dále. Genomové DNA knihovny mohou být prohledávány na aveC a aveC homologické kódující sekvenec za použití technik jako je technika popsána v Benton and Davis, 1977, Science 196: 180 pro bakteriofágové knihovny, a v Grunstein and Hogness, 1975, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 72: 3961-3965 pro plasmidové knihovny. Polynukleotidové molekuly o kterých je známo, že obsahují aveC ORF, jako je například molekula přítomná v plasmidu pSE186 (ATCC 209604) nebo v plasmidu pSE119 (jak je uveden dále), mohou být použity jako sondy při tomto prohledávání. Alternativně mohou být syntetizovány oligonukleotidové sondy, které odpovídají nukleotidovým sekvencím odvozeným z částečné

nebo kompletní aminokyselinové sekvence přečištěného genového produktu homologického k AveC.

Rekombinantní systémy

Klonování a expresní vektory

Předkládaný vynález dále poskytuje rekombinantní klonovací vektory a expresní vektory, které jsou použitelné pro klonování nebo expresi polynukleotidových molekul podle předkládaného vynálezu obsahujících, například, aveC ORF *S. avermitilis* nebo ORF jakéhokoliv homologu aveC. V příkladném provedení poskytuje předkládaný vynález plasmid pSE186 (ATCC 209604), který obsahuje kompletní ORF aveC genu *S. avermitilis*.

Všechny následující popisy týkající se aveC ORF *S. avermitilis* nebo polynukleotidové molekuly obsahující aveC ORF *S. avermitilis* nebo jeho část nebo AveC genového produktu *S. avermitilis*, se také týkají aveC homologů a genových produktů homologických k AveC, pokud není výslovně uvedeno jinak.

Různé vektory byly vyvinuty pro specifické použití v *Streptomyces*, včetně fágů, plasmidů s vysokým počtem kopií, plasmidů s nízkým počtem kopií a *E. coli*-*Streptomyces* kyvadlových vektorů, a jakýkoliv z těchto vektorů může být použit pro provedení předkládaného vynálezu. Ze *Streptomyces* bylo také klonováno mnoho genů pro lékovou resistenci a několik z těchto genů bylo použito ve vektorech jako selektovatelné markery. Příklady v současnosti používaných vektorů pro *Streptomyces* jsou uvedeny, například, v Hutchinson, 1980, *Applied Biochem. Biotech.* 16: 169-190.

Rekombinantní vektory podle předkládaného vynálezu, zejména expresní vektory, jsou výhodně konstruovány tak, že kódující sekvence pro polynukleotidovou molekulu podle předkládaného vynálezu je v operativní asociaci s jedním nebo více regulačními elementy nezbytnými pro transkripci a translaci kódující sekvence za vzniku polypeptidu. Termín "regulační elementy", jak je zde použit, označuje - bez omezení - nukleotidové sekvence, které kódují indukovatelné a neindukovatelné promotory, zesilovače transkripce, operátory a jiné elementy známé v oboru, o kterých je známo, že slouží pro řízení a/nebo regulaci exprese polynukleotidových kódujících sekvencí. Výraz "kódující sekvence je v operativní asociaci" s jedním nebo více regulačními elementy znamená, že regulační elementy účinně řídí a umožňují transkripci kódující sekvence nebo translaci její mRNA, nebo oba tyto děje.

Typickými plasmidovými vektory, které mohou být upraveny tak, aby obsahovaly polynukleotidovou molekulu podle předkládaného vynálezu, jsou pCR-Blunt, pCR2.1 (Invitrogen), pGEM3Zf (Promega) a kyvadlový vektor pWHM3 (Vara et al., 1989, J. Bact. 171: 5872-5881), například.

Způsoby pro konstrukci rekombinantních vektorů obsahujících určité kódující sekvence v operativní asociaci s vhodnými regulačními elementy jsou v oboru dobře známé a mohou být použity při provádění předkládaného vynálezu. Mezi tyto metody patří rekombinantní techniky in vitro, syntetické techniky a genetické rekombinace in vivo. Viz například techniky popsané v Maniatis et al., 1989, výše; Ausubel et al., 1989, výše; Sambrook et al., 1989, výše; Innis et al., 1995, výše; a Erlich et al., 1992, výše.

Regulační elementy těchto vektorů se mohou lišit ve své délce a specificitách. Podle použitého systému hostitel/vektor může být použito mnoho vhodných transkripčních a translačních elementů. Příklady transkripčních regulačních regionů nebo promotorů pro bakterie jsou β -gal promotor, T7 promotor, TAC promotor, λ levý a pravý promotor, trp a lac promotory, trp-lac fúsní promotory a, pro *Streptomyces*, promotory ermE, melC a tipA atd. V konkrétním provedení popsaném dále byl připraven expresní vektor obsahující aveC ORF klonovaný do sousedství silného konstitutivního ermE promotoru ze *Saccharopolyspora erythraea*. Vektor byl transformován do *S. avermitilis* a potom provcedená HPLC analýza produktů fermentace ukázala zvýšený titr produkovaných avermektinů ve srovnání s produkcí ve stejném kmenu, který exprimuje přirozenou aveC alelu.

Expresní vektory pro fúsní proteiny mohou být použity pro expresi AveC genového produktu-fúsního proteinu. Přečištěný fúsní protein může být použit pro získání antiséra proti AveC genovému produktu, pro studium biochemických vlastností AveC genového produktu, pro přípravu AveC fúsních proteinů s odlišnými biochemickými vlastnostmi nebo pro usnadnění identifikace nebo přečištění exprimovaných AveC genových produktů. Možnými expresními vektory pro fúsní proteiny jsou, například, vektory obsahující sekvence kódující β -galaktosidasu a trE fúse, fúse obsahující vazebný protein pro maltosu, fúse obsahující glutathion-S-transferasu a polyhistidinové fúse (nosičové regiony). V alternativním provedení může být AveC genový produkt nebo jeho část fúsován na genový produkt homologický k AveC nebo jeho část, která pochází z jiného druhu nebo kmenu *Streptomyces*, například ze *S. hygroscopicus* nebo *S. griseochromogenes*. V konkrétním provedení popsaném dále a zobrazeném na obr. 7 byl připraven chimerický plasmid obsahující 564 bp region ORF homologický k aveC ze *S.*

hygroscopicus, který nahradil 564 bp region ORF aveC *S. avermitilis*. Takové hybridní vektory mohou být transformovány do buněk *S. avermitilis* a mohou být testovány pro určení jejich vlivu například na poměr produkovaných avermektinů třídy 2:třídy 1.

AveC fúsní proteiny mohou být upraveny tak, aby obsahovaly region užitečný pro přečištění. Například, fúze AveC-vazebný protein pro maltosu mohou být přečištěny za použití amylosové pryskyřice; fúsní proteiny AveC-glutathion-S-transferasa mohou být přečištěny za použití glutathion-agarosových korálek; a fúsní proteiny AveC-polyhistidin mohou být přečištěny za použití divalentní niklové pryskyřice. Alternativě mohou být pro přečištění fúsních proteinů afinitní chromatografií použity protilátky proti proteinovému nebo peptidovému nosiči. Například, nukleotidová sekvence kódující cílový epitop monoklonální protilátky může být vložena do expresního vektoru v operativní asociaci s regulačními elementy a může být umístěna tak, že exprimovaný epitop je fúsovaný na AveC polypeptid. Například, nukleotidová sekvence kódující FLAGTM epitop (International Biotechnologies, Inc.), což je hydrofilní markerový peptid, může být insertována za použití standardních technik do expresního vektoru v místě odpovídajícím, například, karboxylovému konci AveC polypeptidu. Exprimovaný fúsní protein AveC polypeptid-FLAGTM epitop může být potom detekován a afinitně přečištěn za použití komerčně dostupných anti-FLAGTM protilátek.

Expresní vektor kódující AveC fúsní protein může být také upraven tak, aby obsahoval polylinkerové sekvence, které kódují specifická vazebná místa pro proteasy, takže exprimovaný AveC polypeptid může být uvolněn z nosiče nebo fúsního partnera reakcí se specifickou proteasou. Například může vektor pro

fúsní protein obsahovat DNA sekvence kódující štěpící místa pro trombin nebo faktor Xa.

Signální sekvence umístěná před a ve čtecím rámci s aveC ORF může být vložena do expresního vektoru za použití známých technik a slouží pro transport a sekreci exprimovaného genového produktu. Příklady takových signálních sekvencí jsou například signální sekvence z α -faktoru, imunoglobulinů, zevních membránových proteinů, penicillinasy a receptorů T-buněk.

Pro usnadnění selekce hostitelských buněk transformovaných nebo transfektovaných klonovacími nebo expresními vektory podle předkládaného vynálezu může být vektor dále upraven tak, aby obsahoval kódující sekvenci pro produkt reporterového genu nebo jiný selektovatelný marker. Taková kódující sekvence je výhodně v operativní asociaci s kódujícími sekvencemi pro regulační elementy, jak byly popsány výše. Reporterové geny použitelné v předkládaném vynálezu jsou dobře známé v oboru a patří mezi ně například geny kódující zelený fluorescentní protein, luciferasu, xylE a tyrosinazu. Nukleotidové sekvence kódující selektovatelné markery jsou dobře známé v oboru a patří mezi ně, například, geny kódující resistenci na antibiotika nebo antimetabolity, nebo geny, které doplňují auxotrofní požadavky. Příklady takových sekvencí jsou například sekvence kódující resistenci na erythromycin, thiostrepton nebo kanamycin.

Transformace hostitelských buněk

Předkládaný vynález dále obsahuje transformované hostitelské buňky obsahující polynukleotidovou molekulu nebo rekombinantní vektor podle předkládaného vynálezu a nové kmeny nebo buněčné linie získané z těchto buněk. Hostitelskými buňkami vhodnými pro provedení vynálezu jsou výhodně buňky *Streptomyces*, ačkoliv

mohou být použity také jiné prokaryotické a eukaryotické buňky. Takové transformované hostitelské buňky obvykle zahrnují, ale nejsou omezeny na, mikroorganismy, jako jsou bakterie transformované rekombinantní bakteriofágovými DNA, plasmidovými DNA nebo kosmidovými DNA vektory, nebo kvasinky transformované rekombinantními vektory.

Polynukleotidové molekuly podle předkládaného vynálezu jsou určeny pro buňky *Streptomyces*, ale mohou být transformovány také do jiných bakteriálních nebo eukaryotických buněk, například za účelem klonování nebo exprese. Typicky může být použit kmen *E. coli*, jako je například DH5 α kmen, dostupný od American Type Culture Collection (ATCC), Rockville, MD, USA (přírůstkové č. 31343) a z komerčních zdrojů (Stratagene). Výhodnými eukaryotickými hostitelskými buňkami jsou kvasinky, ačkoliv mohou být použity také savčí buňky a hmyzí buňky.

Rekombinantní expresní vektor podle předkládaného vynálezu je výhodně transformován nebo transfektován do jedné nebo více buněk v podstatě homogenní kultury buněk. Expresní vektor je obvykle vložen do hostitelských buněk za použití známých technik, jako je například protoplastová transformace, srážení fosforečnanem vápenatým, zpracování chloridem vápenatým, mikroinjekce, elektroporace, transfekce kontaktem s rekombinantním virem, liposomy-zprostředkovaná transfekce, DEAE-dextranová transfekce, transdukce, konjugace nebo ostřelování mikročásticemi. Selektce transformantů může být provedena za použití standardních technik, jako je selektce buněk exprimujících selektovatelný marker, například gen pro resistenci na antibiotika, který je asociovaný s rekombinantním vektorem, jak bylo uvedeno výše.

Po vložení expresního vektoru do hostitelské buňky může být integrace a udržování aveC kódující sekvence v chromosomu hostitelské buňky nebo episomálně potvrzena za použití standardních technik, jako je southernův přenos, analýza restrikčními enzymy, PCR analýza, včetně PCR s reverzní transkripcí (rt-PCR), nebo imunologickými testy detekujícími předpokládaný genový produkt. Hostitelské buňky obsahující a/nebo exprimující rekombinantní aveC kódující sekvenci mohou být identifikovány jakoukoliv z nejméně čtyř obecných technik známých v oboru, který jsou: (i) DNA-DNA, DNA-RNA nebo RNA-protismyslná RNA hybridizace; (ii) detekce přítomnosti funkcí markerového genu; (iii) hodnocení úrovně transkripce podle exprese aveC-specifických mRNA transkriptů v hostitelské buňce; a (iv) detekce přítomnosti zralého polypeptidového produktu, která je provedena například imunotestem nebo detekcí AveC biologické aktivity (například, produkce specifických poměrů a množství avermektinů ukazuje na AveC aktivitu v, například, *S. avermitilis* hostitelských buňkách).

Exprese a charakterizace rekombinantního AveC genového produktu

Po stabilním vložení aveC kódující sekvence do vhodné hostitelské buňky mohou být transformované hostitelské buňky klonálně propagovány a získané buňky mohou být kultivovány za podmínek umožňujících maximální produkci AveC genového produktu. Takové podmínky obvykle obsahují kultivaci buněk do vysoké hustoty. Pokud obsahuje expresní vektor indukovatelný promotor, tak mohou být pro indukci exprese použity vhodné indukční podmínky, jako je například změna teploty, vyčerpání živin, přidání indukčních činidel (například analogů karbohydrátů, jako je isopropyl- β -D-thiogalaktopyranosid

(IPTG)), akumulace nadbytečných vedlejších produktů metabolismu.

Pokud zůstává AveC genový produkt uvnitř hostitelských buněk, tak jsou buňky sklizeny a provede se lýza buněk a produkt se izoluje a přečistí z lyzátu za extrakčních podmínek známých v oboru, které minimalizují degradaci proteinů, například při 4 °C, a/nebo za přítomnosti inhibitorů proteas. Pokud je exprimovaný AveC genový produkt secernován z hostitelských buněk, tak může být odebráno pouze vyčerpané živné medium a produkt může být izolován z tohoto media.

Exprimovaný AveC genový produkt může být izolován nebo významně přečištěn z buněčných lyzátů nebo z kultivačního media, za použití standardních metod, včetně například jakékoliv kombinace následujících metod: srážení síranem amonným, frakcionace podle velikosti, iontoměničová chromatografie, HPLC, odstředění podle hustoty a afinitní chromatografie. Pokud vykazuje exprimovaný AveC genový produkt biologickou aktivitu, tak může být zvyšování čistoty přípravku sledováno v každém stupni přečišťování pomocí vhodného testu. Pokud nevykazuje exprimovaný AveC genový produkt biologickou aktivitu, tak může detekován například podle velikosti nebo reaktivity s protilátkou specifickou pro AveC, nebo podle přítomnosti fúsní sekvence.

Předkládaný vynález tak poskytuje rekombinantně exprimovaný AveC genový produkt *S. avermitilis* obsahující aminokyselinovou sekvenci kodovanou sekvencí kódující AveC genový produkt plasmidu pSE186 (ATCC 209604), nebo aminokyselinovou sekvenci podle obr. 1 (SEQ ID NO: 2) nebo její významnou část, a jeho homology.

Předkládaný vynález dále poskytuje rekombinantně exprimovaný genový produkt homologický k AveC *S.hygroscopicus* obsahující aminokyselinovou sekvenci SEQ ID NO: 4 nebo její významnou část, a jeho homology.

Předkládaný vynález dále poskytuje způsob pro produkci AveC genového produktu, který obsahuje kultivaci hostitelských buněk transformovaných rekombinantním expresním vektorem, kde uvedený vektor obsahuje polynukleotidovou molekulu obsahující nukleotidovou sekvenci kódující AveC genový produkt, kde tato polynukleotidová molekula je v operativní asociaci s jedním nebo více regulačními elementy, které kontrolují expresi polynukleotidové molekuly v hostitelské buňce, kde tato kultivace je provedena za podmínek umožňujících produkci rekombinantního AveC genového produktu, a získání AveC genového produktu z buněčné kultury.

Rekombinantně produkovaný AveC genový produkt *S.avermitilis* je použitelný pro různé účely, včetně vyhledávání sloučenin, které alterují funkci AveC genového produktu a tak ovlivňují biosyntézu avermektinů, a pro přípravu protilátek namířených proti AveC genovému produktu.

Po získání AveC genového produktu dostatečné čistoty může být tento produkt charakterizován za použití standardních technik, jako je SDS-PAGE, chromatografie s vylučováním podle velikosti, analýza aminokyselinové sekvence, hodnocení biologické aktivity v produkci správných metabolitů v biosyntetické dráze avermektinů, atd. Například, aminokyselinová sekvence AveC genového produktu může být stanovena za použití standardních technik pro sekvenování peptidů. AveC genový produkt může být dále charakterizován pomocí analýzy hydrofilnosti (viz například Hopp and Woods,

1981, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 78: 3824), nebo analogovými softwarovými algoritmy, pro identifikaci hydrofobních a hydrofilních regionů AveC genového produktu. Strukturální analýza může být provedena pro identifikaci regionů AveC genového produktu, které určují specifické sekundární uspořádání. Biofyzikální metody, jako je rentgenová krystalografie (Engstrom, 1974, Biochem. Exp. Biol. 11: 7-13), počítačové modelování (Fletterick and Zoller (ed.), 1986, v: Current Communications in Molecular Biology, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY) a nukleární magnetická rezonance (NMR), mohou být použity pro mapování a studium míst interakcí mezi AveC genovým produktem a jeho substrátem. Informace získané z těchto studií mohou být použity pro výběr nových míst pro mutace v aveC ORF, které by vedly z zisku nových kmenů *S. avermitilis* majících výhodnější charakteristiky produkce avermektinů.

Konstrukce a použití AveC mutantů

Předkládaný vynález poskytuje polynukleotidovou molekulu obsahující nukleotidovou sekvenci, která je stejná jako sekvence kódující AveC genový produkt *S. avermitilis* v plasmidu pSE186 (ATCC 209604) nebo nukleotidová sekvence aveC ORF *S. avermitilis* uvedená na obr. 1 (SEQ ID NO: 1), ale která obsahuje jednu nebo více mutací, takže buňky *S. avermitilis* kmene ATCC 53692, ve kterých byla přirozená aveC alela inaktivována a které exprimují polynukleotidovou molekulu obsahující mutovanou nukleotidovou sekvenci produkují jiné poměry nebo množství avermektinů než buňky kmene *S. avermitilis* ATCC 53692, které exprimují pouze přirozenou aveC alelu.

Podle předkládaného vynálezu mohou být takové polynukleotidové molekuly použity pro produkci nových kmenů

S. avermitilis, které vykazují detekovatelné změny v produkci avermektinů ve srovnání se stejným kmenem, který exprimuje pouze přirozenou *aveC* alelu. Ve výhodném provedení jsou takové polynukleotidové molekuly použitelné pro přípravu nových kmenů *S. avermitilis*, které produkují avermektiny ve sníženém poměru třídy 2:třídy 1 ve srovnání se stejným kmenem, který exprimuje pouze přirozenou *aveC* alelu. V jiném výhodném provedení jsou takové polynukleotidové molekuly použitelné pro přípravu nových kmenů *S. avermitilis*, které produkují vyšší množství avermektinů ve srovnání se stejným kmenem, který exprimuje pouze přirozenou *aveC* alelu. V ještě dalším provedení jsou takové polynukleotidové molekuly použitelné pro produkci nových kmenů *S. avermitilis*, ve kterých byl *aveC* gen inaktivován.

Mutace *aveC* kódující sekvence zahrnují jakékoliv mutace, které způsobují aminokyselinové delece, adice nebo substituce v *AveC* genovém produktu, nebo které vedou ke zkrácení *AveC* genového produktu, nebo k jakékoliv kombinaci výše uvedených změn, a které vedou k požadovaným výsledkům. Například, předkládaný vynález poskytuje polynukleotidové molekuly obsahující sekvenci kódující *AveC* genový produkt *S. avermitilis* v plasmidu pSE186 (ATCC 209604) nebo nukleotidovou sekvenci *aveC* ORF *S. avermitilis* uvedená na obr. 1 (SEQ ID NO: 1), ale která dále obsahuje jednu nebo více mutací, které kódují substituce aminokyselinových zbytků jinými aminokyselinovými zbytky ve vybraných pozicích v *AveC* genovém produktu. V několika příkladných provedeních, které jsou uvedeny dále, mohou být takové substituce provedeny v jakékoliv aminokyselinové pozici 55, 138, 139 nebo 230, nebo v několika těchto pozicích.

Mutace *aveC* kódující sekvence jsou porvedeny jakoukoliv známou technikou, včetně chybové PCR nebo kazetové mutagenese.

Například, oligonukleotidy-řízená mutagenese může být použita pro alteraci aveC ORF sekvence definovaným způsobem, například pro vložení jednoho nebo více restričních míst nebo terminačních kodonů, do specifických regionů v aveC ORF sekvenci. Způsoby jako je způsob popsáný v U.S. patentu 5605793, který obsahuje náhodnou fragmentaci, opakované cykly mutagenese a změn nukleotidů, mohou být také použity pro generování rozsáhlých knihoven polynukleotidů obsahujících nukleotidové sekvence kódující aveC mutace.

Řízené mutace mohou být výhodné, zejména tehdy, pokud slouží pro alteraci jednoho nebo více konzervovaných aminokyselinových zbytků v AveC genovém produktu. Například, srovnání odvozených aminokyselinových sekvencí AveC genových produktů a genových produktů homologických k AveC ze *S. avermitilis* (SEQ ID NO: 2), *S. griseochromogenes* (SEQ ID NO: 5) a *S. hygroscopicus* (SEQ ID NO: 4), jak je uvedeno na obr. 6, ukazuje místa významné konzervace aminokyselinových zbytků mezi těmito kmeny. Řízená mutagenese, která vede ke změně jednoho nebo více z těchto konzervovaných aminokyselinových zbytků, může být zejména účinná v produkci nových mutantních kmenů vykazujících požadované alterace v produkci avermektinů.

Náhodná mutagenese může být také užitečná a může být provedena pomocí vystavení buněk *S. avermitilis* ultrafialovému nebo rentgenovému záření, nebo působením chemických mutagenů, jako je N-methyl-N'-nitrosoguanin, ethylmethansulfonat, kyselina dusitá nebo nitrogenmustard. Pro přehled technik mutagenese viz například Ausubel et al., 1989, výše.

Po připravení mutovaných polynukleotidových molekul jsou tyto molekuly testovány pro určení toho, zda mohou modulovat syntézu avermektinů ve *S. avermitilis*. Ve výhodném provedení je

polynukleotidová molekula obsahující mutované nukleotidové sekvence testována pomocí komplementace kmene *S. avermitilis*, ve kterém byl *aveC* gen inaktivován za dosažení *aveC* negativního (*aveC*⁻) pozadí. V příkladu metody je mutovaná polynukleotidová molekula vložena do expresního plasmidu v operativní asociaci s jedním nebo více regulačními elementy, kde tento plasmid výhodně obsahuje také jeden nebo více genů resistance pro antibiotika umožňujících selekci transformovaných buněk. Tento vektor je potom transformován do *aveC*⁻ hostitelských buněk pomocí známých technik a transformované buňky jsou selektovány a kultivovány ve vhodném fermentačním mediu za podmínek umožňujících nebo indukujících produkci avermektinů. Produkty fermentace jsou potom analyzovány HPLC pro stanovení schopnosti mutované polynukleotidové molekuly komplementovat hostitelskou buňku. Několik vektorů nesoucích mutovanou polynukleotidovou molekulu schopnou snižovat poměr B2:B1 avermektinů, včetně pSE188, pSE199 a pSE231, je uvedeno dále.

Předkládaný vynález poskytuje způsob pro identifikaci mutací *aveC* ORF *S. avermitilis*, které mění poměry a/nebo množství produkovaných avermektinů. Ve výhodném provedení poskytuje předkládaný vynález způsob pro identifikaci mutací *aveC* ORF, které mohou měnit poměr produkovaných avermektinů třídy 2:třídy 1, který obsahuje: (a) stanovení poměru avermektinů třídy 2:třídy 1 produkovaných buňkami kmene *S. avermitilis*, ve kterých byla přirozená *aveC* alela inaktivována a do kterých byla vložena a ve kterých je exprimována polynukleotidová molekula obsahující nukleotidovou sekvenci kódující mutovaný *AveC* genový produkt; (b) stanovení poměru avermektinů třídy 2:třídy 1 produkovaných buňkami stejného kmene *S. avermitilis* jako v kroku (a), které však exprimují pouze *aveC* alelu mající nukleotidovou sekvenci ORF podle obr. 1 (SEQ ID NO: 1) nebo nukleotidovou sekvenci homologickou k této sekvenci; a (c) srovnání poměru

avermektinů třídy 2:třídy 1 produkovaných buňkami *S. avermitilis* kroku (a) s poměrem avermektinů třídy 2:třídy 1 produkovaných buňkami *S. avermitilis* kroku (b); kdy pokud je poměr avermektinů třídy 2:třídy 1 produkovaných buňkami *S. avermitilis* kroku (a) odlišný od poměru avermektinů třídy 2:třídy 1 produkovaných buňkami *S. avermitilis* kroku (b), tak byla identifikována mutace *aveC* ORF, která je schopná měnit poměr avermektinů třídy 2:třídy 1. Ve výhodném provedení mutace snižuje poměr produkovaných avermektinů třídy 2:třídy 1.

V dalším výhodném provedení poskytuje předkládaný vynález způsob pro identifikaci mutací *aveC* ORF nebo genetického konstruktu obsahujícího *aveC* ORF, které mohou měnit množství produkovaných avermektinů, který obsahuje: (a) stanovení množství avermektinů produkovaných buňkami kmene *S. avermitilis*, ve kterých byla přirozená *aveC* alela inaktivována a do kterých byla vložena a ve kterých je exprimována polynukleotidová molekula obsahující nukleotidovou sekvenci kódující mutovaný *AveC* genový produkt nebo obsahující genetický konstrukt obsahující nukleotidovou sekvenci kódující *AveC* genový produkt; (b) stanovení množství avermektinů produkovaných buňkami stejného kmene *S. avermitilis* jako v kroku (a), které však exprimují pouze *aveC* alelu mající nukleotidovou sekvenci ORF podle obr. 1 (SEQ ID NO: 1) nebo nukleotidovou sekvenci homologickou k této sekvenci; a (c) srovnání množství avermektinů produkovaných buňkami *S. avermitilis* kroku (a) s množstvím avermektinů produkovaných buňkami *S. avermitilis* kroku (b); kdy pokud je množství avermektinů produkovaných buňkami *S. avermitilis* kroku (a) odlišné od množství avermektinů produkovaných buňkami *S. avermitilis* kroku (b), tak byla identifikována mutace *aveC* ORF nebo genetického konstrukt, která je schopná měnit množství avermektinů. Ve výhodném provedení mutace zvyšuje množství produkovaných avermektinů.

Všechny výše uvedené metody pro identifikaci mutací jsou provedeny za použití fermentačního kultivačního media doplněného kyselinou cyklohexankarboxylovou, ačkoliv mohou být použity jako prekursory použity také jiné vhodné mastné kyseliny, jako jsou například mastné kyseliny uvedené v tabulce 1.

Po identifikaci polynukleotidové molekuly, která moduluje produkci avermektinů žádoucím způsobem, se může stanovit místo mutace v nukleotidové sekvenci. Například, polynukleotidová molekula mající sekvenci nukleotidů kódující mutovaný AveC genový produkt může být izolována PCR a může být analyzována na sekvenci DNA za použití známých metod. Srovnáním DNA sekvence mutované aveC alely se sekvencí přirozené aveC alely mohou být určeny mutace odpovídající za alteraci produkce avermektinů. V konkrétních provedeních předkládaného vynálezu způsobují *S. avermitilis* AveC genové produkty obsahující buď substituce jedné aminokyseliny v pozici 55 (S55F), 138 (S138T), 139 (A139T) nebo 230 (G230D), nebo dvou aminokyselin v pozicích 138 (S138T) a 139 (A139T), změnu funkce AveC genového produktu, která mění poměr produkovaných avermektinů třídy 2:třídy 1 (viz dále). Proto jsou polynukleotidové molekuly mající nukleotidové sekvence, které kódují mutované *S. avermitilis* AveC genové produkty obsahující aminokyselinové substituce v jednom nebo více aminokyselinových zbytcích 5, 138, 139 nebo 230, nebo v kombinace těchto zbytků, předmětem předkládaného vynálezu.

Předkládaný vynález dále poskytuje prostředky pro přípravu nových kmenů *S. avermitilis*, kde buňky uvedených kmenů obsahují mutovanou aveC alelu, která způsobuje alteraci v produkci avermektinů. Například, předkládaný vynález poskytuje rekombinantní vektory, které mohou být použity pro cílené

vložení jakékoliv polynukleotidové molekuly obsahující mutované nukleotidové sekvence podle předkládaného vynálezu do místa aveC genu na *S. avermitilis* chromosomu, za účelem inserce nebo nahrazení aveC ORF nebo jeho části homologní rekombinací. Nicméně, podle předkládaného vynálezu může polynukleotidová molekula obsahující mutovanou nukleotidovou sekvenci podle předkládaného vynálezu také modulovat biosyntézu avermektinů tehdy, je-li insertována do chromosomu *S. avermitilis* v jiném místě než v aveC genu, nebo pokud je přítomná v buňkách *S. avermitilis* episomálně. Tak předkládaný vynález také poskytuje vektory obsahující polynukleotidovou molekulu obsahující mutovanou nukleotidovou sekvenci podle předkládaného vynálezu, kde tyto vektory mohou být použity pro inserci polynukleotidové molekuly v jiném místě chromosomu *S. avermitilis*, než je aveC gen, nebo které mohou být přítomné episomálně.

Ve výhodném provedení poskytuje předkládaný vynález vektory pro genovou substituci, které mohou být použity pro inserci mutované aveC alely do buněk kmene *S. avermitilis*, čímž vzniknou nové kmeny *S. avermitilis*, jejichž buňky produkují avermektiny ve změněném poměru třídy 2:třídy 1 ve srovnání s buňkami stejného kmene, které exprimují pouze přirozenou aveC alelu. Ve výhodném provedení je poměr produkováných avermektinů třídy 2:třídy 1 snížen. Takové vektory mohou být připraveny za použití mutovaných polynukleotidových molekul přítomných v expresních vektorech podle předkládaného vynálezu, jako je pSE188, pSE199 a pSE231, které jsou uvedeny dále.

V dalším výhodném provedení poskytuje předkládaný vynález vektory, které mohou být použity pro inserci mutované aveC alely do buněk kmene *S. avermitilis*, čímž vzniknou nové kmeny, jejichž buňky produkují avermektiny ve změněném množství ve

srovnání s buňkami stejného kmene, které exprimují pouze přirozenou aveC alelu. Ve výhodném provedení je množství produkovaných avermektinů zvýšeno. V konkrétním provedení takový vektor dále obsahuje silný promotor známý v oboru, jako je například silný konstitutivní ermE promotor ze *Saccharomyces erythraea*, který je umístěn před a který je operativně navázán na aveC ORF. Takovým vektorem může být plasmid pSE189, který je popsán v příkladu 11, nebo může být takový vektor připraven za použití mutované aveC alely plasmidu pSE189.

V jiném výhodném provedení poskytuje předkládaný vynález vektory, které jsou použitelné pro inaktivaci aveC genu v přirozeném kmenu *S. avermitilis*. V příkladném provedení mohou být takové vektory připraveny za použití mutované polynukleotidové molekuly přítomné v plasmidu pSE180 (ATCC 209605), který je popsán dále (obr. 3). Předkládaný vynález dále poskytuje vektory, které obsahují polynukleotidovou molekulu obsahující nebo skládající se z nukleotidových sekvencí, které v normální situaci sousedí s aveC genem in situ v chromosomu *S. avermitilis*, včetně, například, sousedních nukleotidových sekvencí podle obr. 1 (SEQ ID NO: 1), kde tyto vektory mohou být použity pro delecí *S. avermitilis* aveC ORF.

Předkládaný vynález dále obsahuje způsoby pro přípravu nových kmenů *S. avermitilis* tvořených buňkami, které exprimují mutovanou aveC alelu a produkují pozměněný poměr a/nebo množství avermektinů ve srovnání s buňkami stejného kmenu *S. avermitilis*, který exprimuje pouze přirozenou aveC alelu. Ve výhodném provedení poskytuje předkládaný vynález způsob pro přípravu nových kmenů *S. avermitilis* tvořených buňkami, které exprimují mutovanou aveC alelu a které produkují pozměněný poměr avermektinů třídy 2:třídy 1 ve srovnání s buňkami stejného kmenu *S. avermitilis*, které exprimují pouze přirozenou

aveC alelu, kde uvedený způsob obsahuje transformaci buněk *S. avermitilis* vektorem, který nese mutovanou aveC alelu kódující genový produkt, který mění poměr avermektinů třídy 2:třídy 1 produkovaných buňkami kmene *S. avermitilis* exprimujícími mutovanou aveC alelu ve srovnání s buňkami stejného kmene *S. avermitilis*, které exprimují pouze přirozenou aveC alelu, a selekci transformovaných buněk, které produkují pozměněný poměr avermektinů třídy 2:třídy 1 ve srovnání s buňkami stejného kmene *S. avermitilis*, které exprimují pouze přirozenou aveC alelu. Ve výhodném provedení je poměr produkovaných avermektinů třídy 2:třídy 1 snížen.

Ve výhodném provedení poskytuje předkládaný vynález způsob pro přípravu nových kmenů *S. avermitilis* tvořených buňkami, které produkují pozměněné množství avermektinů, kde uvedený způsob obsahuje transformaci buněk *S. avermitilis* vektorem, který nese mutovanou aveC alelu nebo genetický konstrukt obsahující aveC alelu, jehož exprese způsobuje změnu množství avermektinů produkovaných buňkami kmene *S. avermitilis* exprimujícími mutovanou aveC alelu nebo genetický konstrukt ve srovnání s buňkami stejného kmene *S. avermitilis*, které exprimují pouze přirozenou aveC alelu, a selekci transformovaných buněk, které produkují pozměněné množství avermektinů ve srovnání s buňkami stejného kmene *S. avermitilis*, které exprimují pouze přirozenou aveC alelu. Ve výhodném provedení je množství produkovaných avermektinů třídy zvýšeno.

V jiném výhodném provedení poskytuje předkládaný vynález způsob pro přípravu nových kmenů *S. avermitilis* tvořených buňkami, které obsahují inaktivní aveC alelu, kde uvedený způsob obsahuje transformaci buněk *S. avermitilis*, které exprimují přirozenou aveC alelu, vektorem, který inaktivuje aveC alelu, a selekci transformovaných buněk, ve kterých byla

aveC alela inaktivována. Ve výhodném příkladném provedení jsou buňky kmene *S. avermitilis* transformovány vektorem, který nese aveC alelu, která byla inaktivována mutací nebo náhradou části aveC alely heterologní genovou sekvencí, a selekci transformovaných buněk, ve kterých byla přirozená aveC alela nahrazena inaktivní aveC alelou. Inaktivace aveC alely může být stanovena HPLC analýzou produktů fermentace, jak je popsána dále. V konkrétním provedení popsaném dále je aveC alela inaktivována insercí *ermE* genu ze *Saccharopolyspora erythraea* do aveC ORF.

Předkládaný vynález dále poskytuje nové kmeny *S. avermitilis* tvořené buňkami, které byly transformovány jakoukoliv polynukleotidovou molekulou nebo vektorem podle předkládaného vynálezu. Ve výhodném provedení poskytuje předkládaný vynález nové kmeny *S. avermitilis*, jejichž buňky exprimují mutovanou aveC alelu místo nebo kromě přirozené aveC alely, kde buňky těchto nových kmenů produkují avermektiny v pozměněném poměru třídy 2:třídy 1 ve srovnání s produkcí avermektinů třídy 2:třídy 1 v buňkách stejného kmenu, který exprimuje pouze přirozenou alelu. Ve výhodném provedení je poměr produkováných avermektinů třídy 2:třídy 1 snížen. Takové nové kmeny jsou použitelné pro průmyslovou produkci komerčně dostupných avermektinů, jako je doramektin.

Cílem vyhledávacích testů podle předkládaného vynálezu je identifikace mutovaných alel aveC genu, jejichž exprese v buňkách *S. avermitilis* mění, přesněji snižuje, poměr produkováných avermektinů třídy 2:třídy 1. Ve výhodném provedení je poměr B2:B1 avermektinů produkováných buňkami nového kmene *S. avermitilis* podle předkládaného vynálezu exprimujícími mutovanou aveC alelu, která snižuje poměr avermektinů třídy 2:třídy 1 mezi než 1,6:1 a 0:1; ve

výhodnějším provedení je tento poměr od 1:1 do 0:1; a v nejvýhodnějším provedení je tento poměr od 0,84:1 do 0:1. V konkrétním provedení popsaném dále produkují nové buňky podle předkládaného vynálezu cyklohexyl B2: cyklohexyl B1 avermektiny v poměru menším než 1,6:1. V jiném konkrétním provedení popsaném dále produkují nové buňky podle předkládaného vynálezu cyklohexyl B2: cyklohexyl B1 avermektiny v poměru přibližně 0,94:1. V ještě jiném konkrétním provedení popsaném dále produkují nové buňky podle předkládaného vynálezu cyklohexyl B2: cyklohexyl B1 avermektiny v poměru přibližně 0,88:1. V ještě jiném konkrétním provedení popsaném dále produkují nové buňky podle předkládaného vynálezu cyklohexyl B2: cyklohexyl B1 avermektiny v poměru přibližně 0,84:1.

V dalším výhodném provedení poskytuje předkládaný vynález nové kmeny *S. avermitilis* obsahující buňky, které exprimují mutovanou *aveC* alelu nebo genetický konstrukt obsahující *aveC* alelu, místo nebo kromě přirozené *aveC* alely, kde buňky tohoto nového kmene produkují pozměněná množství avermektinů ve srovnání s buňkami stejného kmene, které exprimují pouze přirozenou *aveC* alelu. Ve výhodném provedení produkují nové kmeny vyšší množství avermektinů. V příkladném provedení obsahuje genetický konstrukt dále silný promotor, jako je silný konstitutivní promotor *ermE* ze *Saccharopolyspora erythraea*, který je umístěný před a v operativní vazbě s *aveC* ORF.

V dalším výhodném provedení poskytuje předkládaný vynález nové kmeny *S. avermitilis* obsahující buňky, ve kterých byl *aveC* gen inaktivován. Takové kmeny jsou použitelné jak z důvodů odlišného spektra avermektinů, které produkují ve srovnání s přirozenými kmeny, tak pro stanovení toho, jak ovlivňuje náhodná nebo cílená mutagenese *aveC* genu produkci avermektinů. V konkrétním provedení popsaném dále byly hostitelské buňky

S. avermitilis geneticky upraveny tak, že obsahují inaktivovaný *aveC* gen. Například, kmen SE 180-11, popsáný v příkladech uvedených dále, byl připraven za použití přenosového plasmidu pSE180 (ATCC 209605) (Obr. 3), který byl konstruován pro inaktivaci *aveC* genu *S. avermitilis* insercí *ermE* genu pro resistenci do *aveC* kódujícího regionu.

Předkládaný vynález dále obsahuje rekombinantně exprimovaný, mutovaný *S. avermitilis* *AveC* genový produkt kodovaný jakoukoliv z výše uvedených polynukleotidových molekul podle předkládaného vynálezu, a způsoby jeho přípravy.

Předkládaný vynález dále poskytuje způsob pro produkci avermektinů, který obsahuje kultivaci buněk kmene *S. avermitilis* exprimujících mutovanou *aveC* alelu, která kóduje genový produkt, který mění poměr avermektinů třídy 2:třídy 1 produkovaných buňkami kmene *S. avermitilis* exprimujícími mutovanou alelu ve srovnání s buňkami stejného kmene, které exprimují pouze přirozenou alelu, v kultivačním mediu za podmínek umožňujících produkci avermektinů, a získání uvedených avermektinů z kultury. Ve výhodném provedení je poměr avermektinů třídy 2:třídy 1 produkovaných v kultuře buňkami exprimujícími mutovanou *aveC* alelu snížen. Tento proces umožňuje dosažení vyšší účinnosti při výrobě komerčně hodnotných avermektinů, jako je doramektin.

Předkládaný vynález dále poskytuje způsob pro produkci avermektinů, který obsahuje kultivaci buněk kmene *S. avermitilis* exprimujících mutovanou *aveC* alelu nebo genetický konstrukt obsahující *aveC* alelu, která mění množství avermektinů produkovaných buňkami kmene *S. avermitilis* exprimujícími mutovanou *aveC* alelu nebo genetický konstrukt ve srovnání s buňkami stejného kmene, které neexprimují mutovanou *aveC* alelu

nebo genetický konstrukt, ale pouze přirozenou alelu, v kultivačním mediu za podmínek umožňujících produkci avermektinů, a získání uvedených avermektinů z kultury. Ve výhodném provedení je množství avermektinů produkovaných v kultuře buňkami exprimujícími mutovanou aveC alelu nebo genetický konstrukt zvýšeno.

Předkládaný vynález dále poskytuje nové avermektinové přípravky produkované kmenem *S. avermitilis* exprimujícím mutovanou aveC alelu, která kóduje genový produkt, který snižuje poměr avermektinů třídy 2:třídy 1 produkovaný buňkami kmene *S. avermitilis* exprimujícími mutovanou aveC alelu ve srovnání s buňkami stejného kmene, které exprimují pouze přirozenou aveC alelu, kde avermektiny v novém přípravku jsou produkovány s nižším poměrem třídy 2:třídy 1, než je poměr avermektinů třídy 2:třídy 1 produkovaný buňkami stejného kmene *S. avermitilis*, které exprimují pouze přirozenou aveC alelu. Nové avermektinové přípravky mohou být připraveny ve formě, ve které jsou produkovány ve vyčerpaném fermentačním mediu, nebo mohou být získány z tohoto media. Nové avermektinové přípravky mohou být částečně nebo významně přečištěny z kultivační kapaliny za použití známých biochemických technik pro přečištění, jako je srážení síranem vápenatým, dialýza, frakcionace podle velikosti, iontoměničová chromatografie, HPLC a podobně.

Použití avermektinů

Avermektiny jsou vysoce účinná antiparasitární činidla, které mají použití jako antihelmintika, ektoparasitocidní činidla, insekticidy a akaricidy. Avermektinové sloučeniny připravené způsoby podle předkládaného vynálezu jsou vhodná pro jakékoliv z těchto použití. Například, avermektinové sloučeniny

připravené podle předkládaného vynálezu jsou vhodné pro léčbu různých onemocnění a tsvaů u člověka, zejména pro léčbu onemocnění a stavů způsobených parazitární infekcí, jak jsou v oboru známé. Viz např. Ikeda and Omura, 1997, Chem. Rev. 97(7): 2591-2609. Přesněji, avermektinové sloučeniny připravené podle předkládaného vynálezu jsou účinné pro léčbu různých onemocnění a stavů způsobených endoparasity, jako jsou hlísti, které mohou infikovat člověka, domácí zvířata, prasata, ovce, drůbež, koně a dobytek.

Přesněji, avermektinové sloučeniny podle předkládaného vynálezu jsou účinné proti hlístům, které infikují člověka, stejně jako proti těm, které infikují různé druhy zvířat. Mezi takové hlísty patří gastrointestinální paraziti jako je *Ancylostoma*, *Necator*, *Ascaris*, *Strongyloides*, *Trichinella*, *Capillaria*, *Trichuris*, *Enterobius*, *Dirofilaria* a paraziti, kteří jsou nacházeni v krvi a jiných tkáních nebo orgánech, jako jsou filariové formy a extraintestinální formy *Strongyloides* a *Trichinella*.

Avermektinové sloučeniny podle předkládaného vynálezu jsou také účinné při léčbě ektoparazitárních infekcí, včetně například zamoření savců a ptáků členovci, které jsou způsobeny klíšťaty, roztoči, vešmi, blechami, masačkami, bodavým hmyzem nebo migrujícími larvami dvoukřídlého hmyzu, které mohou postihovat dobytek a koně, například.

Avermektinové sloučeniny podle předkládaného vynálezu jsou také účinné jako insekticidy proti domácím škůdcům, jako jsou například šváby, moli šatní a mouchy, stejně jako proti hmyzu škodícímu uskladněnému zrnu a zemědělským plodinám, jako jsou například pavouci, mšice, housenky a rovnokřídlí, jako jsou například kobylinky.

Mezi zvířata, která mohou být léčena avermektinovými sloučeninami připravenými podle předkládaného vynálezu, patří ovce, dobytek, koně, vysoká zvěř, kozi, prasata, ptáci včetně drůbeže, a psi a kočky.

Avermektinové sloučeniny podle předkládaného vynálezu jsou podány ve formě vhodné pro specifické zamýšlené použití, konkrétní druh léčeného zvířete a podle typu parazita nebo hmyzu, který způsobuje infekci. Při použití jako antiparasitární činidlo může být avermektinová sloučenina připravená podle předkládaného vynálezu podána orálně ve formě kapsle, bolusu, tablety nebo kapaliny, nebo může být podána nástríkem, nebo injekcí nebo ve formě implantátu. Takové prostředky jsou připraveny běžným způsobem, podle standardní veterinární praxe. Kapsle, bolusy nebo tablety mohou být připraveny smísením aktivní složky s vhodným jemně děleným ředidlem nebo nosičem, který dále obsahuje činidlo podporující rozpadavost a/nebo pojivo jako je škrob, laktosa, talek, stearan hořečnatý a podobně. Veterinární prostředky mohou být připraveny rozpuštěním aktivní složky ve vodném roztoku společně s dispergačními nebo smáčivými činidly a podobně. Injekční prostředky mohou být připraveny ve formě sterilních roztoků, které mohou obsahovat další substance, jako jsou například soli a/nebo glukosa upravující izotonicitu roztoku s izotonicitou krve.

Takové prostředky obsahují různé množství aktivní sloučeniny, v závislosti na pacientovi nebo druhu léčeného zvířete, na závažnosti a typu infekce a na tělesné hmotnosti léčeného jedince. Obecně, pro orální podání je vhodná dávka aktivní sloučeniny od přibližně 0,001 do 10 mg na kg tělesné hmotnosti jedince a je podána v jedné dávce nebo je rozdělena do

1-5 denních dávek. Nicméně, mohou být případy, u kterých jsou indikovány vyšší nebo nižší dávky, které jsou určeny lékaři nebo veterinářem podle klinických příznaků.

Alternativně může být avermektinová sloučenina produkovaná podle předkládaného vynálezu podána v kombinaci s potravou pro zvířata a pro tento účel může být připravena koncentrovaná potravinová přísada nebo směs pro smísení s normální potravou pro zvířata.

Pro použití jako insekticid a pro hubení zemědělských škůdců může být avermektinová sloučenina připravená podle předkládaného vynálezu použita ve formě spreje, prášku, emulze a podobně, podle standardních zemědělských zvyklostí.

Příklady provedení vynálezu

Příklad 1: Fermentace *Streptomyces avermitilis* a analýza B2:B1 avermektinů

Kmeny deficientní v aktivitě dehydrogenasy rozvětvených 2-oxo kyselin i 5-O-methyltransferasy neprodukovaly žádné avermektiny, pokud nebylo fermentační medium doplněno mastnými kyselinami. Tento příklad ukazuje, že v takových mutantech je možno získat různé poměry B2:B1 avermektinů, když je biosyntéza iniciována přítomností různých mastných kyselin.

1. Materiály a metody

Streptomyces avermitilis ATCC 53692 byl skladován při -70°C ve formě celého kultivačního media připraveného v očkovacím mediu skládajícím se z: škrobu (Nadex, Laing National) - 20 g; Pharmamedia (Trader's Protein, Memphis, TN) - 15 g; Ardamin pH



(Yeast Products Inc.) - 5 g; uhličitanu vápenatého - 1 g. Konečný objem byl upraven na 1 liter pomocí vody, pH bylo upraveno na 7,2 a medium bylo autoklavováno při 121 °C po dobu 25 minut.

2 ml roztáté suspenze přípravku uvedeného výše byly použity pro očkování do nádob obsahujících 50 ml stejného media. Po 48 hodinové inkubaci při 28°C na rotační třepačce při 180 rpm byly 2 ml media použity pro očkování do nádob obsahujících 50 ml produkčního media, které obsahovalo: škrob - 80 g; uhličitan vápenatý - 7 g; Pharmamedia - 5 g; hydrogenfosforečnan vápenatý - 1 g; síran hořečnatý - 1 g; kyselinu glutamovou - 0,6 g; heptahydrát síranu železnatého - 0,01 g; síran zinečnatý - 0,001 g; síran manganatý - 0,001 g. Konečný objem byl upraven na 1 liter přidáním vody, pH bylo upraveno na 7,2 a medium bylo autoklavováno při 121 °C po dobu 25 minut.

Substráty tvořené různým karboxylovými kyselinami (viz tabulku 1) byly rozpuštěny v methanolu a byly přidány do fermentačního media 24 hodin po naočkování v konečné koncentraci 0,2 g/litr. Fermentační medium bylo inkubováno po dobu 14 dnů při 28 °C, potom bylo medium odstředěno (2500 rpm po dobu 2 minut) a supernatant byl odstraněn. Myceliální peleta byla extrahována acetonem (15 ml), potom dichlormethanem (30 ml) a organická fáze byla separována, přefiltrována a odpařena do sucha. Zbytek byl vyjmut do methanolu (1 ml) a byl analyzován HPLC za použití Hewlett-Packard 1090A kapalinového chromatografu vybaveného skenovacím diodovým detektorem při 240 nm. Použitou kolonou byla Beckman Ultrasphere C-18, 5 µM, 4,6 mm x 25 cm, při teplotě 40 °C. 25 µl výše uvedené roztoku bylo injekčně vneseno do kolony. Eluce byla provedena s lineárním gradientem methanol-voda od 80:20 do 95:5 během 40 min při 0,85 ml/min. Dvě standardní koncentrace cyklohexyl B1 byly použity

pro kalibraci detektoru a byla měřena plocha pod křivkou pro B2 a B1 avermektiny.

2. Výsledky

HPLC retenční časy zjištěné pro B2 a B1 avermektiny a poměry třídy 2:třídy 1 jsou uvedeny v tabulce 1.

Substrát	HPLC retenční čas (min)		Poměr
	B2	B1	B2:B1
kyselina 4-tetrahydropyrankarboxylová	8,1	14,5	0,25
kyselina isomáselná	10,8	18,9	0,5
kyselina 5-furoová	7,6	14,6	0,62
kyselina S-(+)-2-methylmáselná	12,8	21,6	1,0
kyselina cyklohexankarboxylová	16,9	26,0	1,6
kyselina 3-thiofenkarboxylová	8,8	16,0	1,8
kyselina cyklopentankarboxylová	14,2	23,0	2,0
kyselina 3-trifluormethylmáselná	10,9	18,8	3,9
kyselina 2-methylpentanová	14,5	24,9	4,2
kyselina cykloheptankarboxylová	18,6	29,0	15,0

Data uvedená v tabulce 1 ukazují extrémně široké rozmezí poměrů produkovaných B2:B1 avermektinů, což ukazuje na významné odlišnosti v konversi sloučenin třídy 2 na sloučeniny třídy 1, které jsou závislé na charakteru dodané výchozí mastné kyseliny. Tato tabulka ukazuje, že změny poměrů B2:B1 vzniklé v důsledku alterace AveC proteinu mohou být specifické pro konkrétní substráty. Proto musí být vyhledávání mutantů vykazujících změny v poměru B2:B1 pro určitý substrát provedeno za přítomnosti tohoto substrátu. Následující příklad popisuje použití kyseliny cyklohexankarboxylové jako skriningového

substrátu. Tento substrát je použit pouze pro ilustraci předkládaného vynálezu a nijak neomezuje jeho rozsah.

Příklad 2: Izolace aveC genu

Tento příklad popisuje izolaci a charakterizaci regionu chromosomu *Streptomyces avermitilis*, který kóduje AveC genový produkt. Jak bude uvedeno dále, aveC gen byl identifikován jako gen modifikující poměr produkovaných cyklohexyl-B2:cyklohexyl-B1 avermektinů.

1. Kultivace *Streptomyces* pro izolaci DNA

Následující způsob byl použit pro kultivaci *Streptomyces*. Jedna kolonie *S. avermitilis* ATCC 31272 (izolát č. 2) byla izolována na polovičním mediu YPD-6 obsahujícím: Difco kvasinkový extrakt - 5 g; Difco Bacto-pepton - 5 g; dextrosu - 2,5 g; MOPS - 5 g; Difco Bacto agar - 15 g. Konečný objem byl upraven na 1 litr přidáním dH₂O, pH bylo upraveno na 7,0 a medium bylo autoklavováno při 121 °C po dobu 25 minut.

Mycelia kultivovaná na výše uvedeném mediu byla použita pro inokulaci 10 ml TSB media (Difco Tryptic Soy Broth - 30 g, v 1 l dH₂O, autoklavované při 121 °C po dobu 25 minut) ve zkumavce 25 mm x 150 mm, na rotační třepačce (300 rpm) při 28 °C po dobu 48-72 hodin.

2. Izolace chromosomální DNA ze *Streptomyces*

Alikvoty (0,25 ml nebo 0,5 ml) mycelií kultivovaných způsobem popsáním výše byly umístěny do 1,5 ml mikrocentrifugačních zkumavek a buňky byly koncentrovány centrifugací při 12000 x g po dobu 60 sekund. Supernatant byl

odstraněn a buňky byly resuspendovány ve 0,25 ml TSE pufru (20 ml 1,5 M sacharosu, 2,5 ml 1 M Tris-HCl, pH 8,0, 2,5 ml 1 M EDTA, pH 8,0 a 75 ml dH₂O), který obsahoval 2 mg/ml lysozymu. Vzorky byly inkubovány po dobu 20 minut při 37 °C za třepání, byly vneseny do AutoGen 540™ automatizovaného přístroje pro izolaci nukleových kyselin (Integrated Separation Systems, Natick, MA) a genomová DNA byla izolována za použití Cycle 159 (softwarová výbava) podle návodu výrobce.

Alternativně bylo 5 ml mycelií umístěno do zkumavky 17 mm x 100 mm, buňky byly koncentrovány centrifugací při 3000 rpm po dobu 5 minut a supernatant byl odstraněn. Buňky byly resuspendovány v 1 ml TSE pufru, byly koncentrovány centrifugací při 3000 rpm po dobu 5 minut a supernatant byl odstraněn. Buňky byly resuspendovány v 1 ml TSE pufru obsahujícím 2 mg/ml lysozymu a provedla se inkubace při 37 °C s třepáním po dobu 30–60 minut. Po inkubaci se přidalo 0,5 ml 10% dodecylsírany sodného (SDS) a buňky se inkubovaly při 37 °C, dokud nebyla lýza buněk dokončena. Lyzát se inkuboval při 65 °C po dobu 10 minut, ochladil se na teplotu okolí, rozdělil se do dvou 1,5 ml Eppendorfových zkumavek a extrahoval se 1 x 0,5 ml fenol/chloroformem (50% fenol předem uvedený do rovnováhy 0,5 M Tris, pH 8,0; 50% chloroform). Vodná fáze se odebrala a extrahovala se 2 až 5 x chloroformem:isoamylalkoholem (24:1). DNA se vysrážela přidáním 1/10 objemu 3M octanu sodného, pH 4,8, inkubací směsi na ledu po dobu 10 minut, centrifugováním směsi při 15000 rpm při 5 °C po dobu 10 minut a odstraněním supernatantu pro pročištění zkumavky, do které se přidal 1 objem isopropanolu. Směs supernatantu a isopropanolu se potom inkubovala na ledu po dobu 20 minut, centrifugovala se při 15000 rpm po dobu 20 minut při teplotě 5 °C, supernatant se odstranil a DNA peleta se promyla 1x 70% ethanolem. Po usušení

pelety se DNA resuspendovala v TE pufru (10 mM Tris, 1 mM EDTA, pH 8,0).

3. Izolace plasmidové DNA ze *Streptomyces*

Alikvota (1,0 ml nebo 0,5 ml) mycelia byla umístěna do 1,5 ml mikrocentrifugačních zkumavek a buňky byly koncentrovány centrifugací při 12000 x g po dobu 60 sekund. Supernatant byl odstraněn a buňky byly resuspendovány v 1,0 ml 10,3% sacharosy a byly koncentrovány centrifugací při 12000 x g po dobu 60 sekund a supernatant byl odstraněn. Buňky byly potom resuspendovány ve 0,25 ml TSE pufru, který obsahoval 2 mg/ml lysozymu a byly inkubovány po dobu 20 minut při 37 °C za třepání a vneseny do AutoGen 540™ automatizovaného přístroje pro izolaci nukleových kyselin. Plasmidová DNA byla izolována za použití Cycle 106 (softwarová výbava) podle návodu výrobce.

Alternativně bylo 1,5 ml mycelia umístěno do 1,5 ml mikrocentrifugačních zkumavek a buňky byly koncentrovány centrifugací při 12000 x g po dobu 60 sekund. Supernatant byl odstraněn a buňky byly resuspendovány v 1,0 ml 10,3% sacharosy a byly koncentrovány centrifugací při 12000 x g po dobu 60 sekund a supernatant byl odstraněn. Buňky byly potom resuspendovány ve 0,5 ml TSE pufru, který obsahoval 2 mg/ml lysozymu a byly inkubovány po dobu 15-30 minut při 37 °C. Po inkubaci bylo přidáno 0,25 ml alkalického SDS (0,3 N NaOH, 2% SDS) a buňky byly inkubovány při 55 °C po dobu 15-30 minut, dokud nebyl roztok čirý. K roztoku DNA byl přidán octan sodný (0,1 ml, 3M, pH 4,8) a roztok byl potom inkubován na ledu po dobu 10 minut. DNA vzorky byly centrifugovány při 14000 rpm po dobu 10 minut při 5 °C. Supernatant byl odstraněn pro pročištění zkumavky a bylo přidáno 0,2 ml fenol:chloroformu (50% fenol:50% chloroform) a provedlo se jemné promíslení. DNA roztok byl

centrifugován při 14000 rpm po dobu 10 minut při 5 °C a horní vrstva byla odstraněna pro pročištění Eppendorfovi zkumavky. Přidal se isopropanol (0,75 ml), roztok se jemně promísil a potom se inkuboval při teplotě okolí po dobu 20 minut. DNA roztok byl centrifugován při 14000 rpm po dobu 15 minut při 5 °C, supernatant se odstranil a DNA peleta se promyla 70% ethanolem, sušila se a resuspendovala se v TE pufru.

4. Izolace plasmidové DNA z *E. coli*

Jedna transformovaná kolonie *E. coli* byla naočkována do 5 ml Luria-Bertani (LB) media (Bacto-Trypton - 10 g; Bacto - kvasinkový extrakt - 5 g; a NaCl 10 g v 1 litru dH₂O, pH 7,0, autoklavované při 121 °C po dobu 25 minut a doplněné 100 µg/ml ampicilinem). Kultura byla inkubována přes noc a 1 ml alikvota byla vnesena do 1,5 ml mikrocentrifugační zkumavky. Vzorky z kultury byly vneseny do AutoGen 540™ automatizovaného přístroje pro izolaci nukleových kyselin a plasmidová DNA byla izolována za použití Cycle 3 (softwarová výbava) podle návodu výrobce.

5. Příprava a transformace protoplastů *S. avermitilis*

Jednotlivé kolonie *S. avermitilis* byly izolovány na 1/2 YPD-
6. Mycelia byla použita pro inokulaci 10 ml TSB media ve zkumavce 25 mm x 150 mm, která byla inkubována za třepání (300 rpm) při 28 °C po dobu 48 hodin. 1 ml mycelia byl použit pro inokulaci 50 ml YEME media. YEME medium obsahuje na litr: Difco kvasinkový extrakt - 3 g; Difco Bacto-peptod - 5 g; Difco Malt extrakt - 3 g; sacharosu - 300 g. Po autoklavování při 121 °C po dobu 25 minut byly přidány následující složky: 2,5 M MgCl₂.6H₂O (separátně autoklavované při 121 °C po dobu 25 minut) - 2 ml; a glycin (20%) (sterilizovaný filtrací) - 25 ml.

Mycelia byla kultivována při 30 °C po dobu 48-72 hodin a byla získána centrifugací v 50 ml centrifugační zkumavce (Falcon) při 3000 rpm po dobu 20 minut. Supernatant byl odstraněn a mycelia byla resuspendována v P pufru, který obsahoval: sacharosu - 205 g; K₂SO₄ - 0,25 g; MgCl₂.6H₂O - 2,02 g; H₂O - 600 ml; K₂PO₄ (0,2%) - 10 ml; roztok stopových prvků - 20 ml; CaCl₂ . H₂O (3,68%) - 100 ml; a MES pufr (1,0 M, pH 6,5) - 10 ml (roztok stopových prvků obsahoval na litr: ZnCl₂ - 40 mg; FeCl₃.6H₂O - 200 mg; CuCl₂.2H₂O - 10 mg; MnCl₂.4H₂O - 10 mg; Na₂B₄O₇.10 H₂O - 10 mg; (NH₄)₃Mo₇O₂₄.4 H₂O - 10 mg). pH bylo upraveno na 6,5, konečný objem byl upraven na 1 litr a medium bylo horké filtrováno přes 0,45 mikronový filtr.

Mycelia byla peletována při 3000 x rpm po dobu 20 minut, supernatant byl odstraněn a mycelia byla resuspendována ve 20 ml P pufru obsahujícího 2 mg/ml lysozymu. Mycelia byla inkubována při 35 °C po dobu 15 minut a potom byl mikroskopicky stanoven rozsah tvorby protoplastů. Pokud byla tvorba protoplastů dokončená, tak byly protoplasty centrifugovány při 8000 rpm po dobu 10 minut. Supernatant byl odstraněn a protoplasty byly resuspendovány v 10 ml P pufru. Protoplasty centrifugovány při 8000 rpm po dobu 10 minut, supernatant byl odstraněn, protoplasty byly resuspendovány ve 2 ml P pufru a přibližně 1×10^9 protoplastů bylo umístěno do 2,0 ml kryogenických zkumavek (Nalgene).

Zkumavka obsahující 1×10^9 protoplastů byla centrifugována při 8000 rpm po dobu 10 minut, supernatant byl odstraněn a protoplasty byly resuspendovány v 0,1 ml P pufru. 2 µg transformující DNA byly přidány k protoplastům a potom byl okamžitě přidán pracovní T pufr (0,5 ml). Základ pro T pufr obsahoval: PEG-1000 (Sigma) - 25 g; sacharosa - 2,5 g; H₂O - 83

ml. pH bylo upraveno na 8,8 pomocí 1N NaOH (sterilizovaného filtrací) a základ pro T-pufr byl sterilizován filtrací a uskladněn při 4 °C. Pracovní T pufr, připravený v den použití, obsahoval: základ pro T pufr - 8,3 ml; K₂PO₄ (4 mM) - 1,0 ml; CaCl₂.2 H₂O (5 M) - 0,2 ml; a TES (1 M, pH 8) - 0,5 ml. Každá složka pracovního T pufru byla samostatně sterilizována filtrací.

Během 20 sekund od přidání T pufru k protoplastům byl přidán také 1 ml P pufru a protoplasty byly centrifugovány při 8000 rpm po dobu 10 minut. Supernatant byl odstraněn a protoplasty byly resuspendovány v 0,1 ml P pufru. Protoplasty byly potom umístěny na RM14 medium, které obsahovalo: sacharosu - 205 g; K₂SO₄ - 0,25 g; MgCl₂.6 H₂O - 10,12 g; glukosu - 10 g; Difco Casamino kyseliny - 0,1 g; Difco kvasinkový extrakt - 5 g; Difco Oatmeal Agar - 3 g; Difco Bacto Agar - 22 g; dH₂O - 800 ml. Roztok byl autoklavován při 121 °C po dobu 25 minut. Po autoklavování byly přidány následující sterilní složky: K₂PO₄ (0,5% - 10 ml; CaCl₂.2 H₂O (5 M) - 5 ml; L-prolin (20%) - 15 ml; MES pufr (1,0 M, pH 6,5) - 10 ml; roztok stopových prvků (jak byl popsán výše) - 2 ml; cykloheximid (25 mg/ml) - 40 ml); a 1 N NaOH - 2 ml. 25 ml RM14 media bylo použito na plotnu a plotny byly sušeny po dobu 24 hodin před použitím.

Protoplasty byly inkubovány při 95% vlhkosti při 30 °C po dobu 20-24 hodin. Pro selekci transformantů resistantních na thiostrepton byl na RM14 regenerační plotny rovnoměrně nanesen 1 ml pufru obsahujícího 125 µg/ml thiostreptonu. Tento pufr obsahoval na 100 ml: sacharosu - 10,3 g; roztok stopových prvků (jak byl popsán výše) - 2 ml; a MES (1 M, pH 6,5) - 1 ml. Protoplasty byly inkubovány při 95% vlhkosti při 30 °C po dobu 7-14 dnů, doku nebyly viditelné kolonie resistantní na thiostrepton (Thio^r).

6. Transformace protoplastů *Streptomyces lividans*

V některých případech byly pro transformaci použity *S. lividans* (získané od John Innes Institute, Norwich, U.K.). Metody a prostředky pro kultivaci, protoplastování a transformování *S. lividans* jsou popsány v Hopwood et al., 1985, Genetic Manipulation of *Streptomyces*, A Laboratory Manual, John Innes Foundation, Norwich, U.K., a byly provedeny způsobem popsaným v této publikaci. Plasmidová DNA byla izolována z transformantů *S. lividans* způsobem popsaným výše.

7. Analýza fermentace kmenů *S. avermitilis*

Mycelia *S. avermitilis* kultivovaná na 1/2 YPD-6 po dobu 4-7 dnů byla naočkována do zkumavek 1 x 6 palců obsahujících předem připravené medium a 5 mm skleněné korálky. Předpřipravené medium obsahovalo: rozpustný škrob (buď řídký varem upravený škrob nebo KOSO, Japan Corn Starch Co., Nagoya) - 20 g/l; Pharmamedia - 15 g/l; Ardamin pH - 5 g/l (Champlain Ind., Clifton, NJ); CaCO_3 - 2 g/l; 2x bcfa ("bcfa" označuje mastné kyseliny s rozvětveným řetězcem) obsahující konečnou koncentraci v mediu 50 ppm kyseliny 2-(+/-)-methylnáselné, 60 ppm kyseliny methylnáselné a 20 ppm kyseliny isovalerové. pH bylo upraveno na pH 7,2 a medium bylo autoklavováno při 121 °C po dobu 25 minut.

Zkumavka se třepala při úhlu 17° při 215 rpm při 29 °C po dobu 3 dnů. 2 ml alikvota očkovací kultury byla použita pro inokulaci 300 ml Erlenmeyerovi zkumavky obsahující 25 ml produkčního media, které obsahovalo: škrob (buď řídký varem upravený škrob nebo KOSO) - 160 g/l; Nutrisoy (Archer Daniels Midland, Decatur, IL) - 10 g/l; Ardamin pH - 10 g/l; K_2HPO_4 - 2

g/l; $\text{MgSO}_4 \cdot 4 \text{H}_2\text{O}$ - 2 g/l; $\text{FeSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$ - 0,02 g/l; MnCl_2 - 0,002 g/l; $\text{ZnSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$ - 0,002 g/l; CaCO_3 - 14 g/l; 2x bcfa (jako výše); a kyselinu cyklohexankarboxylovou (CHC) (připravenou jako 20% roztok při pH 7,0) - 800 ppm. pH bylo upraveno na pH 6,9 a medium bylo autoklavováno při 121 °C po dobu 25 minut.

Po inokulaci byla zkumavka inkubována při 29 °C po dobu 12 dnů za třepání při 200 rpm. Po inkubaci byl ze zkumavky odebrán 2 ml vzorek, byl naředěn 8 ml methanolu, promísen a směs byla centrifugována při 1250 x g po dobu 10 minut pro peletování drtě. Supernatant byl potom analyzován HPLC za použití Beckman Ultrasphere ODS kolony (25 cm x 4,6 mm ID) s průtokem 0,75 ml/min a za detekce podle absorpance při 240 nm. Mobilní fázi byl methanol/voda/acetonitril (86/8,9/5,1).

8. Izolace PKS genů *S. avermitilis*

Byla připravena kosmidová knihovna *S. avermitilis* (ATCC 31272, SC-2) chromosomální DNA a byla hybridizována ketosynthasovou (KS) sondou připravenou z fragmentu genu pro polyketid-synthasu (PKS) *Saccharopolyspora erythraea*. Podrobný popis přípravy kosmidových knihoven je uveden například v Sambrook et al., 1989, výše. Podrobný popis přípravy knihoven *Streptomyces* chromosomální DNA je uveden v Hopwood et al., 1985, výše. Kosmidové klony obsahující regiony hybridizující na ketosynthasu byly identifikovány hybridizací na 2,7 kb NdeI/Eco47III fragment z pEX26 (získaný od Dr. P. Leadlay, Cambridge, UK). Přibližně 5 ng pEX26 bylo tráveno NdeI a Eco47III. Reakční směs byla vnesena na 0,8% SeaPlaque GTG agarosový gel (FMC BioProducts, Rockland, ME). 2,7 kb NdeI/Eco47III fragment byl excidován z gelu po elektroforese a DNA byla získána z gelu za použití GELase™ od Epicentre Technologies, za použití Fast protokolu. 2,7 kb NdeI/Eco47III

fragment byl označen [α - 32 P]dCTP (deoxycytidin-5'-trifosfat, tetra(trimethylammoniová) sůl, [α - 32 P]-) (NEN-DuPont, Boston, MA) za použití BRL Nick Translation systému (BRL Life technologies, Inc., Gaithersburg, MD, podle návodu výrobce. Typická reakce byla provedena v objemu 0,05 ml. Po adici 5 μ l stop pufru byla značená DNA oddělena od neinkorporovaných nukleotidů za použití G-25 Sephadex Quick SpinTM kolony (Boehringer Mannheim) podle návodu výrobce.

Přibližně 1800 kosmidových klonů bylo vyšetřováno hybridizací kolonií. Bylo identifikováno 10 klonů, které hybridizovaly silně na KS sondu *Sacch. erythraea*. *E. coli* kolonie obsahující kosmidovou DNA byly kultivovány na LB kapalném mediu a kosmidová DNA byla izolována z každé kultury na AutoGen 540TM automatizovaném přístroji pro izolaci za použití Cycle 3 (softwarové vybava) podle návodu výrobce. Mapování restrikčními endonukleasami a southernův přenos ukázaly, že pět klonů obsahuje překrývající se chromosomální regiony. *S. avermitilis* genomová BamHI restrikční mapa pěti kosmidů (t.j. pSE65, pSE66, pSE67, pSE68, pSE69) byla konstruována analýzou překrývajících se kosmidů a hybridizací (obr. 4).

9. Identifikace DNA, která moduluje poměry avermektinů B2:B1 a identifikace aveC ORF

Následující metody byly použity pro testování subklonovaných fragmentů získaných z pSE66 kosmidového klonu na jejich schopnost modulovat poměry avermektinů B2:B1 v AveC mutantech. pSE66 (5 μ g) byl tráven SacI a BamHI. Reakční směs byla vnesena na 0,8% SeaPlaqueTM GTG agarosový gel (FMC BioProducts, 2,9 kb fragment byl excidován z gelu po elektroforéze a DNA byla

získána z gelu za použití GELase™ od Epicentre Technologies, za použití Fast protokolu. Přibližně 5 µg kyvadlového vektoru pWHM3 (Vara et al., 1989, J. Bacteriol. 171: 5872-5881) bylo tráveno SacI a BamHI. Přibližně 0,5 µg 2,9 kb insertu a 0,5 µg tráveného pWHM3 bylo smíseno a provedla se inkubace přes noc s 1 jednotkou ligasy (New England Biolabs, Inc., Beverly, MA) při 15 °C, v celkovém objemu 20 µl, podle návodu výrobce. Po inkubaci se 5 µl ligační směsi inkubovalo při 70 °C po dobu 10 minut, ochladilo se na teplotu okolí a použilo se pro transformaci kompetentních *E. coli* DH5α buněk (BRL) podle návodu výrobce. Plasmidová DNA byla izolována z transformantů resistantních na ampicilin a přítomnost 2,9 kb SacI/BamHI insertu byla potvrzena restrikční analýzou. Plasmid byl označen pSE119.

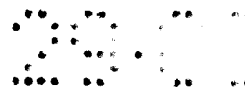
Protoplasty *S. avermitilis* kmene 1100-SC38 (Pfizer in-house kmen) byly připraveny a transformovány pSE119 způsobem popsáným v části 5. Kmen 1100-S38 je mutant, který produkuje významně více cyklohexyl-B2 formy avermektinu než cyklohexyl-B1 formy avermektinu, když mu je dodávána kyselina cyklohexankarboxylová (B2:B1 je přibližně 30:1). pSE119 použitý pro transformaci protoplastů *S. avermitilis* byl izolován buď z *E. coli* kmenu GM 2163 (získaného od Dr. B.J. Bachmann, Curator, *E. coli* Genetic Stock Center, Yale University), *E. coli* kmenu DM1 (BRL) nebo *S. lividans* kmenu TK64. Transformanty kmenu 1100-SC38 resistantní na thiostrepton byly izolovány a byla provedena HPLC analýza produktů fermentace. Transformanty *S. avermitilis* kmenu 1100-SC38 obsahující pSE119 produkovaly změněný poměr cyklohexyl-B2:cyklohexyl-B1 avermektinů přibližně 3,7:1 (tabulka 2).

Po potvrzení toho, že pSE119 může modulovat poměr B2:B1 avermektinů v AveC mutantech byla insertovaná DNA sekvenována.

Přibližně 10 µg pSE119 bylo izolováno za použití kitu pro izolování DNA (Qiagen, Valencia, CA) podle návodu výrobce a tato DNA byla sekvenována za použití ABI 373A Automatizovaného DNA sekvenátoru (Perkin Elmer, Foster City, CA). Sekvenační data byla sestavena a editována za použití Genetic Computer Group programů (GCG, Madison, WI). DNA sekvence a aveC ORF jsou uvedeny na obr. 1 (SEQ ID NO: 1).

Nový plasmid, označený jako pSE118, byl připraven následujícím způsobem. Přibližně 5 µg pSE66 bylo tráveno SphI a BamHI. Reakční směs byla vnesena na 0,8% SeaPlaqueTM GTG agarosový gel (FMC BioProducts, 2,8 kb SphI/BamHI fragment byl excidován z gelu po elektroforéze a DNA byla získána z gelu za použití GELaseTM od Epicentre Technologies, za použití Fast protokolu. Přibližně 5 µg kyvadlového vektoru pWHM3 (Vara et al., 1989, J. Bacteriol. 171: 5872-5881) bylo tráveno SphI a BamHI. Přibližně 0,5 µg 2,8 kb insertu a 0,5 µg tráveného pWHM3 bylo smíseno a provedla se inkubace přes noc s 1 jednotkou ligasy (New England Biolabs) při 15 °C, v celkovém objemu 20 µl, podle návodu výrobce. Po inkubaci se 5 µl ligační směsi inkubovalo při 70 °C po dobu 10 minut, ochladilo se na teplotu okolí a použilo se pro transformaci kompetentních E. coli DH5α buněk podle návodu výrobce. Plasmidová DNA byla izolována z transformantů resistentních na ampicilin a přítomnost 2,8 kb SphI/BamHI insertu byla potvrzena restriční analýzou. Plasmid byl označen pSE118. Insertované DNA v pSE118 a pSE119 se překrývají v přibližně 838 nukleotidech (obr. 4).

Protoplasty *S. avermitilis* kmene 1100-SC38 byly transformovány pSE118 způsobem popsáným výše. Transformanty kmenu 1100-SC38 resistentní na thiostrepton byly izolovány a byla provedena HPLC analýza produktů fermentace. Transformanty



S. avermitilis kmenu 1100-SC38 obsahující pSE118 neprodukovaly změněný poměr cyklohexyl-B2:cyklohexyl-B1 avermektinů ve srovnání s kmenem 1100-SC38 (tabulka 2).

10. PCR amplifikace *aveC* genu z chromosomální DNA *S. avermitilis*

1,2 kb fragment obsahující *aveC* ORF byl izolován z chromosomální DNA *S. avermitilis* PCR amplifikací za použití primerů navržených na základě *aveC* nukleotidové sekvence uvedené výše. PCR primery byly získány od Genosys Biotechnologies Inc. (Texas). Pravostranný primer měl sekvenci: 5'-TCACGAAACCGGACACAC-3' (SEQ ID NO: 6) a levostranný primer měl sekvenci: 5'-CATGATCGCTGAACCGAG-3' (SEQ ID NO: 7). PCR reakce byla provedena za použití Deep VentTM polymerasy (New England Biolabs) v pufru dodávaném výrobcem a za přítomnosti 300 μ M dNTP, 10% glycerolu, 200 pmol každého primeru, 0,1 μ g templátu a 2,5 jednotek enzymu v konečném objemu 100 μ l, za použití Perkin Elmer Cetus teplotního cyklovače. Teplotní profil prvního cyklu byl 95 °C po dobu 5 minut (denaturační krok), 60 °C po dobu 2 minut (tepelné zpracování) a 72 °C po dobu 2 minut (extenze). Dalších 24 cyklů mělo stejný teplotní profil s tou výjimkou, že denaturační krok byl zkrácen na 45 sekund a tepelné zpracování bylo zkráceno na 1 minutu.

Produkt PCR byl zpracován elektroforesou na 1% agarosovém gelu a byl detekován jeden DNA proužek velikosti přibližně 1,2 kb. DNA byla přečištěna z gelu a byla ligována s 25 ng linearizovaného pCR-Blun vektoru s lepivými konci (Invitrogen) v molárním poměru vektoru:insertu 1:10 podle návodu výrobce. Ligační směs byla použita pro transformaci One ShotTM kompetentních *E. coli* buněk (Invitrogen) podle návodu výrobce. Plasmidová DNA byla izolována z transformantů resistentních na

ampicilin a přítomnost 1,2 kb insertu byla potvrzena restriční analýzou. Plasmid byl označen jako pSE179.

Insertová DNA z pSE179 byla izolována trávením BamHI/XbaI, byla separována elektroforesou, byla přečištěna z gelu a byla ligována s kyvadlovým vektorem pWHM3, který byl také tráven BamHI/XbaI, v celkové DNA koncentraci 1 μ g a molárním poměru vektor:insert 1:5. Ligační směs byla použita pro transformaci kompetentních *E. coli* DH5 α buněk podle návodu výrobce. Plasmidová DNA byla izolována z transformantů resistantních na ampicilin a přítomnost 1,2 kb insertu byla potvrzena restriční analýzou. Plasmid, který byl označen jako pSE186 (obr. 2, ATCC 209604), byl transformován do *E. coli* DM1 a plasmidová DNA byla izolována z transformantů resistantních na ampicilin.

Výsledky

Byl identifikován 2,9 kb SacI/BamHI fragment pSE119, který po transformaci do *S. avermitilis* kmene 1100-SC38 významně mění poměr produkovaných avermektinů B2:B1. Za normálních okolností má *S. avermitilis* kmene 1100-SC38 poměr B2:B1 přibližně 30:1, ale po transformaci vektorem obsahujícím 2,9 kb SacI/BamHI fragment se poměr B2:B1 avermektinům sníží na přibližně 3,7:1. Post-fermentační analýza kultur transformantů potvrdila přítomnost transformující DNA.

2,9 kb fragment pSE119 byl sekvencován a byl identifikován 0,9 kb ORF (obr. 1) (SEQ ID NO: 1), který obsahuje PstI/SphI fragment, který byl dříve mutován pro produkci pouze B2 produktů (Ikeda et al., 1995, výše). Srovnávání tohoto ORF nebo jemu odpovídajícího polypeptidu se známými databázemi (GenEBML, SWISS-PROT) neukázalo žádnou silnou homologii se známými DNA nebo proteinovými sekvencemi.

Tabulka 2 ukazuje fermentační analýzu *S. avermitilis* kmene 1100-SC38 transformovaného různými plasmidy.

Tabulka 2

Kmen <i>S. avermitilis</i> (transformující plasmid)	počet testovaných transformantů	průměrný poměr B2:B1
1100-SC38 (žádný)	9	30,66
1100-SC38 (pWHM3)	21	31,3
1100-SC38 (pSE119)	12	3,7
1100-SC38 (pSE118)	12	30,4
1100-SC38 (pSE185)	14	27,9

Příklad 3: Konstrukce AveC mutantů *S. avermitilis*

Tento příklad popisuje konstrukci několika různých AveC mutantů *S. avermitilis* za použití prostředků a způsobů popsaných výše. Obecný popis technik pro vkládání mutací do genu *Streptomyces* je uveden v Kieser and Hopwood, 1991, Meth. Enzym. 204: 430-458. Podrobnější popis je uveden v Anzai et al., 1988, J. Antibiot. XLI(2): 226-233, a v Stutzman-Engwall et al., 1992, J. Bacteriol. 174(1): 144-154. Tyto práce jsou zde úplně uvedeny jako odkazy.

1. Inaktivace aveC genu *S. avermitilis*

AveC mutanty obsahující inaktivované aveC geny byly konstruovány za použití několika metod, jak jsou podrobně popsány dále.

V první metodě byl 640 bp SphI/PstI fragment vnitřní k aveC genu v pSE119 (plasmidu popsanému výše) nahrazen ermE genem (pro resistenci na erythromycin) ze *Sacch. erythraea*. ErmE gen



byl izolován z pIJ4026 (od John Innes Institute, Norwich, U.K.; viz též Bibb et al., 1985, Gene 41: 357-368) trávením restriktivními enzymy BglII a EcoRI, po kterém následovala elektroforéza a přečištění fragmentu z gelu. Tento 1,7 kb fragment byl ligován do pGEM7Zf (Promega), který byl tráven BamHI a EcoRI a ligační směs byla transformována do kompetentních *E. coli* DH5 α buněk podle návodu výrobce. Plasmidová DNA byla izolována z transformantů resistentních na ampicilin a přítomnost 1,7 kb insertu byla potvrzena restriktivní analýzou. Plasmid byl označen jako pSE27.

pSE118 (popsaný výše) byl tráven SphI a BamHI, produkt trávení byl zpracován elektroforesou a 2,8 kb SphI/BamHI insert byl přečištěn z gelu. pSE119 byl tráven PstI a EcoRI, produkt trávení byl zpracován elektroforesou a 1,5 kb PstI/EcoRI insert byl přečištěn z gelu. Kyvadlový vektor pWHM3 byl tráven BamHI a EcoRI. pSE27 byl tráven PstI a SphI, produkt trávení byl zpracován elektroforesou a 1,7 kb PstI/SphI insert byl přečištěn z gelu. pSE118 (popsaný výše) byl tráven SphI a BamHI, produkt trávení byl zpracován elektroforesou a 2,8 kb SphI/BamHI insert byl přečištěn z gelu. Všechny čtyři fragmenty (t.j. 2,8 kb, 1,5 kb, 7,2 kb, 1,7 kb) byly ligovány dohromady ve 4-cestné ligaci. Ligační směs byla transformována do kompetentních *E. coli* DH5 α buněk podle návodu výrobce. Plasmidová DNA byla izolována z transformantů resistentních na ampicilin a přítomnost správného insertu byla potvrzena restriktivní analýzou. Plasmid byl označen jako pSE180 (obr. 3; ATCC 209605).

pSE180 byl transformován do *S. lividans* TK64 a transformované kolonie byly identifikovány podle resistance na thiostrepton a erythromycin. pSE180 byl izolován ze *S. lividans* a byl použit pro transformaci protoplastů *S. avermitilis*. Byly

identifikovány 4 transformanty *S. avermitilis* resistantní na thiostrepton a byly připraveny protoplasty, které byly umístěny na plotny za neselektivních podmínek do RM14 media. Po regeneraci protoplastů byly jednotlivé kolonie vyšetřovány na přítomnost resistance na erythromycin a na nepřítomnost resistance na thiostrepton, což ukazuje na chromosomální integraci inaktivovaného *aveC* genu a na ztrátu volného replikonu. Byl identifikován $Erm^r Thio^s$ transformant a byl označen jako kmen SE180-11. Z kmene SE180-11 byla izolována celková chromosomální DNA, byla trávena restričními enzymy BamHI, HindIII, PstI nebo SphI, byla zpracována elektroforesou na 0,8% agarosovém gelu, byla přenesena na nylonové membrány a byla hybridizována *ermE* sondou. Tyto analýzy ukázaly, že došlo k chromosomální integraci *ermE* genu pro resistenci a současně deleci 640 bp PstI/SphI fragmentu dvojitým crossing-overem. HPLC analýza fermentačních produktů kmene SE180-11 ukázala, že normální avermektiny nebyly nadále produkovány (obr. 5A).

Ve druhé metodě pro inaktivaci *aveC* genu byl 1,7 kb *ermE* gen odstraněn z chromosomu *S. avermitilis* kmene SE180-11, za zanechání 640 bp PstI/SphI delece v *aveC* genu. Genový přenosový plasmid byl konstruován následujícím způsobem: pSE180 byl částečně tráven XbaI a 11,4 kb fragment byl přečištěn z gelu. 11,4 kb proužek neobsahoval 1,7 kb *ermE* gen pro resistenci. DNA byla potom ligována a byla transformována do *E. coli* DH5 α buněk. Plasmidová DNA byla izolována z transformantů resistantních na ampicilin a přítomnost správného insertu byla potvrzena restriční analýzou. Tento plasmid, který byl označen jako pSE184, byl transformován do *E. coli* DM1 a plasmidová DNA byla izolována z transformantů resistantních na ampicilin. Tento plasmid byl použit pro transformaci protoplastů *S. avermitilis* kmene SE180-11. Protoplasty byly připraveny z transformantů kmene SE180-11 resistantních na thiostrepton a

byly umístěny jako jednotlivé kolonie na RM14. Po regeneraci protoplastů byly jednotlivé kolonie testovány na nepřítomnost jak resistance na erythromycin, tak resistance na thiostrepton, která ukazuje na chromosomální integraci inaktivní aveC alely a na ztrátu volného replikonu obsahujícího ermE gen. Byl identifikován jeden Erm^rThio^s transformant a byl označen jako SE184-1-13. Analýza fermentačních produktů kmene SE184-1-13 ukázala, že normální avermektiny nebyly nadále produkovány a že SE184-1-13 má stejný fermentační profil jako SE180-11.

Ve třetí metodě pro inaktivaci aveC genu byl do chromosomálního aveC genu vložen posun čtecího rámce přidáním dvou G po C v nukleotidové pozici 471 za použití PCR, což vytvoří BspEI místo. Přítomnost upraveného BspEI místa byla užitečná pro detekci genové substituce. PCR primery byly navrženy tak, aby vkládaly mutaci posouvající čtecí rámec do aveC genu a byly získány od Genosys Biotechnologies, Inc. Pravostranný primer měl sekvenci: 5'-GGTTCGGATGCCGTTCTCG-3' (SEQ ID NO: 8) a levostranný primer měl sekvenci: 5'-AACTCCGGTCGACTCCCTTC-3' (SEQ ID NO: 9). PCR podmínky byly stejné jako v příkladu 2, sekci 10. 666 bp PCR produkt byl tráven SphI za vzniku dvou fragmentů délky 278 bp a 388 bp. 388 bp fragment byl přečištěn z gelu.

Plasmid pro genovou náhradu byl připraven následujícím způsobem: kyvadlový vektor pWHM3 byl tráven EcoRI a BamHI. pSE119 byl tráven BamHI a SphI, produkt trávení byl zpracován elektroforesou a 840 bp fragment byl přečištěn z gelu. pSE119 byl tráven EcoRI a XmnI, produkt trávení byl zpracován elektroforesou a 1,7 kb fragment byl přečištěn z gelu. Všechny čtyři fragmenty (t.j. 7,2 kb, 840 bp, 1,7 kb a 388 bp) byly ligovány dohromady 4-cestnou ligací. Ligační směs byla transformována do kompetentních E. coli DH5α buněk. Plasmidová

DNA byla izolována z transformantů resistantních na ampicilin a přítomnost správného insertu byla potvrzena restriční analýzou a potom analýzou DNA sekvence. Tento plasmid, který byl označen pSE185, byl transformován do *E. coli* DM1 a plasmidová DNA byla izolována z transformantů resistantních na ampicilin. Tento plasmid byl použit pro transformaci protoplastů *S. avermitilis* kmene 1100-SC38. Transformanty 1100-SC38 resistantní na thioestrepton byly izolovány a jejich fermentační produkty byly analyzovány HPLC analýzou. pSE185 neměnil po transformaci do *S. avermitilis* kmene 1100-SC38 významně poměr B2:B1 avermektinů (Tabulka 2).

pSE185 byl použit pro transformaci protoplastů *S. avermitilis* pro generování mutací posunu čtecího rámce v chromosomálním *aveC* genu. Protoplasty byly připraveny z transformantů resistantních na thioestrepton a byly naočkovány jako jednotlivé kolonie na RM14. Po regeneraci protoplastů byly jednotlivé kolonie vyšetřovány na absenci resistance na thioestrepton. Chromosomální DNA z kolonií resistantních na thioestrepton byly izolovány a byla analyzována PCR na přítomnost mutací způsobujících posun čtecího rámce, které byly integrovány do chromosomu. PCR primery byly navrženy na základě *aveC* nukleotidové sekvence a byly získány od Genosys Biotechnologies, Inc. (Texas). Pravostranný PCR primer měl sekvenci: 5'-GCAAGGATACGGGGACTAC-3' (SEQ ID NO: 10) a levostranný PCR primer měl sekvenci: 5'-GAACCGACCGCCTGATAC-3' (SEQ ID NO: 11). PCR podmínky byly stejné jako v příkladu 2, sekci 10. Získaný 543 bp PCR produkt byl tráven BspEI za vzniku tří fragmentů délky 368 bp, 96 bp a 79 bp, což ukazuje na chromosomální integraci inaktivovaného *aveC* gelu a na ztrátu volného replikonu.

Fermentační analýza *S. avermitilis* mutantů obsahujících mutaci způsobující posun čtecího rámce v *aveC* genu ukázala, že normální avermektiny nebyly nadále produkovány a že tyto mutanty mají stejné HPLC profily fermentace jako kmeny SE180-11 a SE184-1-13. Byl identifikován jeden Thio^s transformant a byl označen jako kmen SE185-5a.

Dále, byly připraveny mutace v *aveC* genu, které mění nukleotid v pozici 520 z G na A, což vede ke změně kodonu kódujícího tryptofan (W) v pozici 116 na terminační kodon. Kmen *S. avermitilis* s touto mutací neprodukoval normální avermektiny a měl stejný fermentační profil jako kmeny SE180-11, SE184-1-13 a SE185-5a.

Dále byly připraveny mutace v *aveC* genu, které mění jak: (i) nukleotid v pozici 97 z G na A, což mění aminokyselinu v pozici 256 z glycinu (G) na aspartat (D); a (ii) nukleotid v pozici 996 z T na C, což mění aminokyselinu v pozici 275 z tyrosinu (Y) na histidin (H). Kmen *S. avermitilis* s těmito mutacemi (G256D/Y275H) neprodukoval normální avermektiny a měl stejný fermentační profil jako kmeny SE180-11, SE184-1-13 a SE185-5a.

Kmeny SE180-11, SE184-1-13, SE185-5 a další zde uvedené kmeny *S. avermitilis* nesoucí *aveC* inaktivující mutace jsou nástrojem pro hodnocení vlivu jiných mutací v *aveC* genu. pSE186, který obsahuje přirozenou kopii *aveC* genu, byl transformován do *E. coli* DM1 a plasmidová DNA byla izolována z transformantů resistantních na ampicilin. Tato pSE186 DNA byla použita pro transformaci protoplastů kmene pSE180-11 *S. avermitilis*. Byly izolovány transformanty kmene SE180-11 resistantní na thiostrepton, byla stanovena přítomnost resistance na erythromycin a produkty fermentace Thio^rErm^r transformantů byly analyzovány HPLC. Přítomnost funkčního *aveC*

genu v transformantech nahrazovala normální produkci avermektinů v kmenu SE180-11 (obr. 5B).

2. Analýza mutací aveC genu, které ovlivňují poměr tříd B2:B1

Jak bylo popsáno výše, *S. avermitilis* kmen SE180-11 obsahující inaktivní aveC gen byl komplementován transformací plasmidem obsahujícím funkční aveC gen (pSE186). Kmen SE180-11 byl také použit jako hostitelský kmen pro charakterizaci dalších mutací v aveC genu, jak je popsáno dále.

Chromosomální DNA byla izolována z kmenu 1100-SC38 a byla použita jako templát pro PCR amplifikaci aveC genu. 1,2 kb ORF byl izolován PCR amplifikací za použití primerů navržených podle aveC nukleotidové sekvence. Pravostranný primer měl sekvenci SEQ ID NO: 6 a levostranný primer měl sekvenci SEQ ID NO: 7 (viz příklad 2). Podmínky PCR a subklonování byly stejné, jak je popsáno v příkladu 2. Analýza DNA sekvence 1,2 kb ORF ukázala mutaci v aveC genu, která mění nukleotid v pozici 337 z C na T, což mění aminokyselinu v pozici 55 ze serinu (S) na fenylalanin (F). aveC gen obsahující S55F mutaci byl subklonován do pWHM3 za vzniku plasmidu, který byl označen pSE187 a který byl použit pro transformaci protoplastů *S. avermitilis* kmene SE180-11. Transformanty kmene SE180-11 resistantní na thiostrepton byly izolovány, byla stanovena přítomnost resistance na erythromycin a produkty fermentace Thio^rErm^r transformantů byly analyzovány HPLC. Přítomnost aveC genu kódujícího změnu v aminokyselinovém zbytku 55 (S55F) nahrazovala normální produkci avermektinů v kmenu SE180-11 (obr. 5C); nicméně, poměr cyklohexyl B2: cyklohexyl B1 byl přibližně 26:1, ve srovnání s kmenem SE180-11 transformovaným pSE186, který měl poměr B2:B1 přibližně 1,6:1 (tabulka 3), což

ukazuje na to, že jediná mutace (S55F) ovlivňuje poměr produkovaných cyklohexyl B2: cyklohexyl B1 avermektinů.

Byla identifikována jiná mutace v aveC genu, která mění nukleotid v pozici 862 z G na A, což mění aminokyselinu v pozici 230 ze glycinu (G) na aspartat (D). Kmen *S. avermitilis* nesoucí tuto mutaci (G230D) produkoval avermektiny v poměru B2:B1 přibližně 30:1.

3. Mutace redukující poměr B2:B1

Bylo vytvořeno několik mutací, které snižují množství produkovaného cyklohexyl B2 ku cyklohexyl B1.

Byla identifikována mutace v aveC genu, která mění nukleotid v pozici 588 z G na A, což mění aminokyselinu v pozici 139 z alaninu (A) na threonin (T). aveC gen obsahující A139T mutaci byl subklonován do pWHM3 za vzniku plasmidu, který byl označen pSE188 a který byl použit pro transformaci protoplastů *S. avermitilis* kmene SE180-11. Transformanty kmene SE180-11 resistantní na thiostrepton byly izolovány, byla stanovena přítomnost resistance na erythromycin a produkty fermentace Thio^rErm^r transformantů byly analyzovány HPLC. Přítomnost mutovaného aveC genu kódujícího změnu v aminokyselinovém zbytku 139 (A139T) obnovila produkci avermektinů v kmenu SE180-11 (obr. 5D); nicméně, poměr B2:B1 byl přibližně 0,94:1, což ukazuje, že tato mutace snižuje pomer cyklohexyl B2:cyklohexyl B1. Tento výsledek byl neočekávaný, protože publikované výsledky, stejně jako výsledky mutací popsaných výše, vedly pouze k inaktivaci aveC genu nebo ke zvýšení produkce B2 formy avermektinů vzhledem k B1 formě (tabulka 3).

Protože A139T mutace mění B2:B1 poměr ve prospěch B1, byla připravena mutace, která kóduje threonin místo serinu v aminokyselinové pozici 138. pSE186 byl tráven EcoRI a byl klonován do pGEM3Zf (Promega), který byl tráven EcoRI. Tento plasmid, který byl označen jako pSE186a, byl tráven ApaI a KpnI, DNA fragmenty byly separovány na agarosovém gelu a dva fragmenty 3,8 kb a 0,4 kb byly přečištěny z gelu. 1,2 kb DNA insert z pSE186 byl použit jako PCR templát pro vložení jednonukleotidové substituce v pozici 585. PCR primery byly navrženy tak, aby vkládaly mutaci v nukleotidové pozici 585 a byly získány od Genosys Biotechnologies Inc. (Texas). Pravostranný PCR primer měl sekvenční:

5'-GGGGGCGGGCCCGGGTGC GGAGGCGGAAATGCCCCCTGGCGACG-3' (SEQ ID NO: 12); a levostranný PCR primer měl sekvenci:

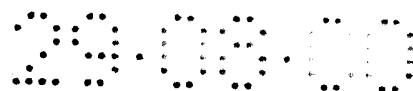
5'-GGAACCGACCGCCTGATACA-3' (SEQ ID NO: 13). PCR reakce byla provedena za použití Advantage GC genomic PCR kitu (Clontech Laboratories, Palo Alto, CA) v pufru dodávaném výrobcem za přítomnosti 200 M dNTP, 200 pmol každého primeru, 50 ng templátové DNA, 1,0 M GC-Melt a 1 jednotky KlenTaq Polymerase Mix v konečném objemu 50 µl. Teplotní profil prvního cyklu byl 94 °C po dobu 1 minut; potom 25 cyklů o 94 °C, 30 sekund a 68 °C, 2 minuty; a 1 cyklus při 68 °C, 3 minuty. PCR produkt délky 295 bp byl tráven ApaI a KpnI za vzniku 254 bp fragmentu, který byl zpracován elektroforesou a přečištěn z gelu. Všechny tři fragmenty (3,8 kb, 0,4 kb a 254 bp) byly ligovány dohromady 3-cestnou ligací. Ligační směs byla transformována do kompetentních E. coli DH5α buněk. Plasmidová DNA byla izolována z transformantů resistentních na ampicilin a přítomnost správného insertu byla potvrzena restriční analýzou. Tento plasmid byl označen pSE198.

pSE198 byl tráven EcoRI, byl klonován do pWHM3, který byl tráven EcoRI a byl transformován do *E. coli* DH5 α . Plasmidová DNA byla izolována z transformantů resistantních na ampicilin a přítomnost správného insertu byla potvrzena restriční analýzou a potom analýzou DNA sekvence. Tato plasmidová DNA byla transformována do *E. coli* DM1 a plasmidová DNA byla izolována z transformantů resistantních na ampicilin a přítomnost správného insertu byla potvrzena restriční analýzou a potom analýzou DNA sekvence. Tento plasmid, který byl označen jako pSE199, byl použit pro transformaci protoplastů *S. avermitilis* kmene SE180-11. Transformanty kmene SE180-11 resistantní na thiostrepton byly izolovány, byla stanovena přítomnost resistance na erythromycin a fermentační produkty Thio^rErm^r transformantů byly analyzovány HPLC analýzou. Přítomnost mutovaného aveC genu kódujícího změnu v aminokyselinovém zbytku 138 (S138T) nahrazovala normální produkci avermektinů v kmenu SE180-11; nicméně, poměr B2:B1 byl přibližně 0,88:1, což ukazuje, že tato mutace snižuje produkci cyklohexyl B2 vzhledem k cyklohexyl B1 (tabulka 3). Tento poměr B2:B1 je ještě nižší, než poměr 0,94:1 pozorovaný pro A139T mutaci připravenou transformací kmene SE180-11 pSE188, jak bylo popsáno výše.

Byla připravena jiná mutace pro vložení threoninu do aminokyselinových pozic 138 a 139. 1,2 kb DNA insert z pSE186 byl použit jako DNA temlát. PCR primery byly navrženy tak, aby vkládaly mutace v nukleotidových pozicích 585 a 588 a byly získány od Genosys Biotechnologies, Inc. (Texas). Pravostranný PCR primer měl sekvenci:
5'-GGGGGCGGGCCCGGTGCGGAGGCGGAAATGCCGCTGGCGACGACC-3' (SEQ ID NO: 14); a levostranný PCR primer měl sekvenci:
5'-GGAACATCACGGCATTACACC-3' (SEQ ID NO: 15). PCR reakce byla provedena za podmínek uvedených v tomto příkladu výše. PCR

produkt délky 449 bp byl tráven ApaI a KpnI za vzniku 254 bp fragmentu, který byl zpracován elektroforesou a přečištěn z gelu. pSE186a byl tráven ApaI a KpnI, DNA fragmenty byly separovány na agarosovém gelu a dva fragmenty délky 3,8 kb a 0,4 kb byly přečištěny z gelu. Všechny tři fragmenty (3,8 kb, 0,4 kb a 254 bp) byly ligovány dohromady 3-cestnou ligací a ligační směs byla transformována do kompetentních *E. coli* DH5 α buněk. Plasmidová DNA byla izolována z transformantů resistantních na ampicilin a přítomnost správného insertu byla potvrzena restriční analýzou. Tento plasmid byl označen pSE230.

pSE230 byl tráven EcoRI, byl klonován do pWHM3, který byl tráven EcoRI a byl transformován do buněk *E. coli* DH5 α . Plasmidová DNA byla izolována z transformantů resistantních na ampicilin a přítomnost správného insertu byla potvrzena restriční analýzou a potom analýzou DNA sekvence. Tento plasmid byl transformován do *E. coli* DM1 a plasmidová DNA byla izolována z transformantů resistantních na ampicilin a přítomnost správného insertu byla potvrzena restriční analýzou. Tento plasmid, který byl označen jako pSE231, byl použit pro transformaci protoplastů *S. avermitilis* kmene SE180-11. Transformanty kmene SE180-11 resistantní na thiostrepton byly izolovány, byla stanovena přítomnost resistance na erythromycin a Thio^rErm^r transformaty byly analyzovány fermentací. Přítomnost dvojité mutovaného aveC genu kódujícího S138T/A139T nahrazovala normální produkci avermektinů v kmenu SE180-11; nicméně, poměr B2:B1 byl přibližně 0,84:1, což ukazuje, že tato mutace dále snižuje produkci cyklohexyl B2 vzhledem k cyklohexyl B1 (tabulka 3) na ještě nižší poměr, než je snížení pozorované při transformaci kmenu SE180-11 pSE188 nebo pSE199, jak bylo popsáno výše.



Tabulka 3

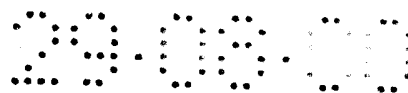
Kmen <i>S. avermitilis</i> (transformační plasmid)	Počet testovaných transformantů	Relativní konc. B2	Relativní konc. B1	Průměrný poměr B2:B1
SE180-11 (žádný)	30	0	0	0
SE180-11 (pWHM3)	30	0	0	0
SE180-11 (pSE186)	26	222	140	1,59
SE180-11 (pSE187)	12	283	11	26,3
SE180-11 (pSE188)	24	193	206	0,94
SE180-11 (pSE199)	18	155	171	0,88
SE180-11 (pSE231)	6	259	309	0,84

Tyto výsledky jsou první demonstrací specifických mutací *aveC* genu, které vedou k produkci vyšších množství komerčně výhodnějších avermektinů třídy 1 vzhledem k avermektinům třídy 2.

Příklad 4: Konstrukce 5'-delečních mutantů

Jak bylo uvedeno výše, *S. avermitilis* nukleotidová sekvence uvedená na obr. 1 (SEQ ID NO: 1) obsahuje čtyři různé GTG kodony v pozicích 42, 174, 177 a 180, které jsou potenciálními start kodony. Tento příklad popisuje konstrukci mnohotných delecí 5' regionu *aveC* ORF (obr. 1, SEQ ID NO: 1), které byly provedeny pro stanovení toho, které z těchto kodonů mohou fungovat jako start kodony v *aveC* ORF pro expresi proteinů.

Fragmenty *aveC* genu s různými delecemi na 5' konci byly izolovány z chromosomální DNA *S. avermitilis* PCR amplifikací. PCR primery byly navrženy podle *aveC* DNA sekvence a byly získány od Genosys Biotechnologies, Inc. Pravostranné primery



měly sekvence: 5'-AACCCATCCGAGCCGCTC-3' (SEQ ID NO: 16) (D1F1); 5'-TCGGCCTGCCAACGAAC-3' (SEQ ID NO: 17) (D1F2); 5'-CCAACGAACGTGTAGTAG-3' (SEQ ID NO: 18) (D1F3); a 5'-TGCAGGCGTACGTGTTTCAGC-3' (SEQ ID NO: 19) (D2F2). Levostranné primery měly sekvence: 5'-CATGATCGCTGAACCGA-3' (SEQ ID NO: 20); 5'-CATGATCGCTGAACCGAGGA-3' (SEQ ID NO: 21); a 5'-AGGAGTGTGGTGCCTCTGGA-3' (SEQ ID NO: 22). PCR reakce byla provedena způsobem popsáným v příkladu 3.

PCR produkty byly separovány elektroforesou na 1% agarosovém gelu a byl detekován jeden proužek délky buď 1,0 kb, nebo 1,1 kb. PCR produkty byly přečištěny z gelu a byly ligovány s 25 ng linearizovaného pCR2.1 vektoru (Invitrogen) v molárním poměru vektor:insert 1:10, podle návodu výrobce. Ligační směsi byly použity pro transformaci One Shot™ kompetentních *E. coli* buněk (Invitrogen) podle návodu výrobce. Plasmidová DNA byla izolována z transformantů resistentních na ampicilin a přítomnost insertu byla potvrzena restriční analýzou a analýzou DNA sekvence. Tyto plasmidy byly označeny pSE190 (získaný pomocí primeru D1F1), pSE191 (získaný pomocí primeru D1F2), pSE192 (získaný pomocí primeru D1F3) a pSE193 (získaný pomocí primeru D2F2).

DNA inserty byly všechny tráveny BamHI/XbaI, byly separovány elektroforesou, přečištěny z gelu a odděleně ligovány s kyvadlovým vektorem pWHM3, který byl tráven BamHI/XbaI, v celkové DNA koncentraci 1 µg v molárním poměru vektor:insert 1:5. Ligační směsi byly použity pro transformaci kompetentních *E. coli* DH5α buněk. Plasmidová DNA byla izolována z transformantů resistentních na ampicilin a přítomnost správného insertu byla potvrzena restriční analýzou. Tyto plasmidy byly označeny pSE194 (D1F1), pSE195 (D1F2), pSE196 (D1F3) a pSE197 (D2F2), které byly každý zvlášť transformovány do *E. coli* DM1,

plasmidová DNA byla izolována z transformantů resistantních na ampicilin a přítomnost správného insertu byla potvrzena restriční analýzou. Tyto DNA byly použity pro transformaci protoplastů *S. avermitilis* kmene SE180-11. Transformanty kmene SE180-11 resistantní na thiostrepton byly izolovány, byla stanovena přítomnost resistance na erythromycin a produkty fermentace Thio^rErm^r transformátů byly analyzovány HPLC analýzou pro stanovení toho, které z GCG míst je nutné pro aveC expresi. Výsledky ukazují, že GTG kodon v pozici 42 může být eliminován bez narušení aveC exprese, protože pSE194, pSE195 a pSE196, které neobsahují GTG v pozici 42, ale které obsahují všechna další tři GTG místa v pozicích 174, 177 a 180, byly schopné obnovit normální produkci avermektinů při transformaci do SE180-11. Normální produkce avermektinů nebyla obnovena po transformaci kmene SE180-11 pSE197, který neobsahuje žádné ze čtyř GTG míst (Tabulka 4).

Tabulka 4

Kmen <i>S. avermitilis</i> (transformační plasmid)	Počet testovaných transformantů	Relativní konc. B2	Relativní konc. B1	Průměrný poměr B2:B1
SE180-11 (žádný)	6	0	0	0
SE180-11 (pWHM3)	6	0	0	0
SE180-11 (pSE186)	6	241	152	1,58
SE180-11 (pSE194)	6	35	15	2,43
SE180-11 (pSE195)	6	74	38	1,97
SE180-11 (pSE196)	6	328	208	1,58
SE180-11 (pSE197)	12	0	0	0

Příklad 5: Klonování aveC homologů ze *S. hygroscopicus* a *S. griseochromogenes*

Předkládaný vynález umožňuje identifikaci a klonování genů homologických k *aveC* z jiných kmenů *Streptomyces* produkujících avermektin nebo milbemycin. Například, kosmidová knihovna *S. hygroscopicus* (FERM-BP-1901) genomové DNA byla hybridizována s 1,2 kb *aveC* sondou ze *S. avermitilis*, jak byla popsána výše. Bylo identifikováno několik kosmidových klonů, které vykazovaly silnou hybridizaci. Chromosomální DNA byla izolována z těchto kosmidů a byl identifikován 4,9 kb fragment, který hybridizoval s *aveC* sondou. Tato DNA byla sekvenována a byla identifikován ORF (SEQ ID NO: 3), který vykazoval významnou homologii s *aveC* ORF *S. avermitilis*. Aminokyselinová sekvence (SEQ ID NO: 4) odvozená od *S. hygroscopicus* homologického *aveC* ORF je uvedena na obr. 6.

Dále, kosmidová knihovna genomové DNA *S. griseochromogenes* byla hybridizována s 1,2 kb *aveC* sondou ze *S. avermitilis*, jak byla popsána výše. Bylo identifikováno několik silně hybridizujících kosmidových klonů. Chromosomální DNA byla izolována z těchto kosmidů a byl identifikován 5,4 kb *Pst*I fragment, který hybridizoval s *aveC* sondou. Tato DNA byla sekvenována a byl identifikován parciální ORF homologický s *aveC*, který měl významnou homologii s *aveC* ORF *S. avermitilis*. Odvozená aminokyselinová sekvence (SEQ ID NO: 5) je uvedena na obr. 6.

Analýza DNA a aminokyselinové sekvence *aveC* homologů *S. hygroscopicus* a *S. griseochromogenes* ukázaly, že tyto regiony mají významnou homologii (přibližně 50% identitu sekvence na úrovni aminokyselin) jak navzájem, tak s *aveC* *S. avermitilis* a *AveC* genovým produktem (obr. 6).

Příklad 6: Konstrukce plasmidu s *aveC* genem za *ermE* promotorem



1,2 kb aveC ORF z pSE186 byl subklonován v pSE34, což je kyvadlový vektor pWHM3 obsahující 300 bp ermE promotor insertovaný jako Kpn/BamHI fragment v Kpn/BamHI místě pWHM3 (viz Ward et al., 1986, Mol. Gen. Genet. 203: 468-478). pSE186 byl tráven BamHI a HindIII, produkt trávení byl zpracován elektroforesou a 1,2 kb fragment byl izolován z agarosového gelu a ligován s pSE34, který byl tráven BamHI a HindIII. Ligační směs byla transformována do kompetentních *E. coli* DH5 α buněk podle návodu výrobce. Plasmidová DNA byla izolována z transformantů resistentních na ampicilin a přítomnost 1,2 kb insertu byla potvrzena restriční analýzou. Tento plasmid, který byl označen pSE189, byl transformován do *E. coli* DM1 a plasmidová DNA byla izolována z transformantů resistentních na ampicilin. Protoplasty kmene 1100-SC38 *S. avermitilis* byly transformovány pSE189. Transformanty kmene 1100-SC38 resistentní na thiostrepton byly analyzovány a produkty jejich transformace byly analyzovány HPLC.

Transformanty kmene 1100-SC38 *S. avermitilis* produkovaly změněný poměr cyklohexyl-B2:cyklohexyl-B1 avermektinů (přibližně 3:1), ve srovnání s kmenem 1100-SC38 (přibližně 34:1) a celková produkce avermektinů byla zvýšena na přibližně 2,4-násobek ve srovnání s kmenem 1100-SC38 transformovaným pSE119 (tabulka 5).

pSE189 byl transformován také do protoplastů přirozeného kmene *S. avermitilis*. Byly izolovány transformanty resistentní na thiostrepton a produkty fermentace byly analyzovány HPLC. Celkové množství avermektinů produkované přirozenými *S. avermitilis* transformovanými pSE189 bylo zvýšeno přibližně na 2,2-násobek ve srovnání s přirozenými *S. avermitilis* transformovanými pSE119 (tabulka 5).



Tabulka 5

Kmen <i>S. avermitilis</i> (transformační plasmid)	Počet testovaných transformantů	Relat. množství B2	Relat. množství B1	Relativní množství celkových avermektinů	Průměrný poměr B2:B1
1100-SC38	6	155	4,8	176	33,9
1100-SC38 (pSE119)	9	239	50,3	357	4,7
1100-SC38 (pSE189)	16	546	166	849	3,3
přirozený	6	59	42	113	1,41
přirozený (pSE119)	6	248	151	481	1,64
přirozený (pSE189)	5	545	345	1,071	1,58

Příklad 7: Chimerický plasmid obsahující sekvence *aveC* ORF *S. avermitilis* a *aveC* homologu *S. hygroscopicus*

Byl připraven hybridní plasmid označený pSE350, který obsahoval 564 bp část *aveC* homologu *S. hygroscopicus* nahrazující 564 bp homologickou část *aveC* ORF *S. avermitilis* (obr. 7). pSE350 byl připraven za použití *Bsa*AI restrikčního místa, které je konzervované v obou sekvencích (*aveC* pozice 225) a *Kpn*I restrikčního místa, které je přítomné v *aveC* genu *S. avermitilis* (*aveC* pozice 810). *Kpn*I místo bylo vloženo do DNA *S. hygroscopicus* PCR za použití pravostranného primeru 5'-CTTCAGGTGTACGTGTTTCG-3' (SEQ ID NO: 23) a levostranného primeru 5'-GAACTGGTACCAGTGCCC-3' (SEQ ID NO: 24) (od Genosys Biotechnologies), za použití PCR podmínek popsanych v příkladu 2. Produkt PCR byl tráven *Bsa*AI a *Kpn*I, fragmenty byly separovány elektroforesou na 1% agarosovém gelu a z gelu byl izolován 564 bp *Bsa*AI/*Kpn*I fragment. pSE179 (popsaný v příkladu

2, sekci 10) byl tráven KpnI a HindIII a fragmenty byly separovány elektroforesou na 1% agarosovém gelu a z gelu byl izolován 4,5 kb fragment. pSE179 byl tráven HindIII a BsaAI, fragmenty byly separovány elektroforesou na 1% agarosovém gelu a z gelu byl izolován 0,2 kb BsaAI/HindIII fragment. 4,5 kb HindIII/KpnI fragment, 0,2 kb BsaAI/HindIII fragment a 564 bp BsaAI/KpnI fragment ze *S. hygroscopicus* byly ligovány dohromady 3-cestnou ligací a ligační směs byla transformována do kompetentních *E. coli* DH5 α buněk. Plasmidová DNA byla izolována z transformantů resistantních na ampicilin a přítomnost správného insertu byla potvrzena restrikční analýzou za použití KpnI a AvaI. Plasmid byl tráven HindIII a XbaI za zisku 1,2 kb insertu, který byl potom ligován s pWHM3, který byl tráven HindIII a XbaI. Ligační směs byla transformována do kompetentních *E. coli* DH5 α buněk, plasmidová DNA byla izolována z transformantů resistantních na ampicilin a přítomnost správného insertu byla potvrzena restrikční analýzou za použití HindIII a AvaI. Tato plasmidová DNA byla transformována do kompetentních *E. coli* DM1 buněk, plasmidová DNA byla izolována z transformantů resistantních na ampicilin a přítomnost správného insertu byla potvrzena restrikční analýzou a analýzou DNA sekvence. Tento plasmid byl označen pSE350 a byl použit pro transformaci protoplastů *S. avermitilis* kmene SE180-11. Transformanty kmene SE180-11 resistantní na thiostrepton byly izolovány, byla stanovena přítomnost resistance na erythromycin a fermentační produkty Thio^rErm^r transformátů byly analyzovány HPLC analýzou. Výsledky ukazují, že transformanty obsahující *S. avermitilis*/*S. hygroscopicus* hybridní plasmid produkují průměrný poměr B2:B1 přibližně 109:1 (tabulka 6).



Tabulka 6

Kmen <i>S. avermitilis</i> (transformační plasmid)	Počet testovaných transformantů	Relativní konc. B2	Relativní konc. B1	Průměrný poměr B2:B1
SE180-11 (žádný)	8	0	0	0
SE180-11 (pWHM3)	8	0	0	0
SE180-11 (pSE350)	16	233	2	109

Uložení biologických materiálů

Následující biologický materiál byl uložen v American Type Culture Collection (ATCC), 12301 Parklawn Drive, Rockville, MD, 20852, USA, 29.1.1998, pod následujícími přírůstkovými čísly:

<u>Plasmid</u>	<u>Přírůstkové č.</u>
plasmid pSE180	209605
plasmid pSE186	209604

Všechny výše citované patenty, patentové přihlášky a publikace jsou zde uvedeny jako odkazy ve své úplnosti.

Předkládaný vynález není omezen popsány specifickými provedeními, které jsou uvedeny pro dokreslení jednotlivých aspektů vynálezu, a funkčně ekvivalentní metody a složky spadají do rozsahu vynálezu. Kromě toho, různé modifikace vynálezu, kromě popsanych modifikací, budou jasné odborníkům v oboru z uvedeného popisu a připojených výkresů. Takové modifikace spadají do rozsahu připojených patentových nároků.

Seznam sekvencí

<110> Pfizer Products Inc. (všechny přihlášky mimo U.S.)

<120> Gen Streptomyces avermitilis řídící poměr B2:B1
avermektinů

<130> PC9916A

<140>

<141>

<150> 60/074636

<151> 1998-02-13

<160> 24

<170> PatentIn vers. 2.0 - beta

<210> 1

<211> 1229

<212> DNA

<213> Streptomyces avermitilis

<220>

<221> CDS

<222> (174)..(1085)

<400> 1

tcacgaaacc ggacacacca cacacacgaa ggtgagacag cgtgaacca tccgagccgc 60

tcggcctgcc caacgaacgt gtagtagaca cccgaccgtc cgatgccacg 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 gca aca tan 360

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

tgg 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> S. 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

29.08.00

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 ggccgctcggc 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 cgg gca gtg ccc gag ctg 681
 Val Ser Phe Ala Gly Val Ser Val Trp Thr Arg Ala Val Pro Glu Leu
 195 200 205

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

29.08.00

210 215 220
 gct tgc 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 tgc ctg atg gac ggc gct ccc ccg gac cgg ctc ccc gaa ttc ttc 969
 Phe Ser Leu Met Asp Gly Ala Pro Pro Asp Arg Leu Pro Glu Phe Phe
 290 295 300
 cgt ccg gcg gcc ggc tac tga gaccgccggc accaccacg tacccgatgt 1020
 Arg Pro Ala Ala Gly Tyr
 305 310
 gcgcgatgtg cctgatgcgc ctgatgtacc cgggggtgtca tcggctcacc tgtggcgccct 1080
 catgcggtga gcgctccgcc tcgtccttgt tccggctcct gggctccacg accatacgga 1140
 gcggccgggg 1150

<210> 4

<211> 310

<212> PRT

<213> Streptomyces hygroscopicus

<400> 4

Val Phe Thr Leu Pro Val Thr Leu Trp Ala Cys Val Gly Ala Leu Val
 1 5 10 15

Leu Gly Leu Gln Val Tyr Val Phe Ala Ala Trp Leu Ala Asp Ser Gly
 20 25 30

Tyr Arg Ile Glu Lys Ala Ser Pro Ala Arg Gly Gly Gly Asp Ser Glu
 35 40 45

Arg Ile Ala Asp Val Leu Ile Pro Leu Leu Ser Val Val Gly Ala Val
 50 55 60

Val Leu Ala Val Cys Leu Tyr Arg Arg Cys Arg Ala Arg Arg Arg Leu
 65 70 75 80
 Thr Phe Asp Ala Ser Leu Phe Ile Gly Leu Leu Ser Ala Ser Trp Gln
 85 90 95
 Ser Pro Leu Met Asn Trp Ile Asn Pro Val Leu Ala Ser Asn Val Asn
 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

29.08.00

<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

20

ggttccggat gccgttctcg

<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 gcctgatata

20

<210> 14
<211> 46
<212> DNA
<213> Streptomyces avermitilis
<400> 14

gggggcgggc ccgggtgcgg aggcggaaat gccgctggcg acgacc

46

<210> 15
<211> 20
<212> DNA
<213> Streptomyces avermitilis
<400> 15

ggaacatcac ggcattcacc

20



<210> 16
<211> 18
<212> DNA
<213> Streptomyces avermitilis
<400> 16

aacccatccg agccgctc

18

<210> 17
<211> 17
<212> DNA
<213> Streptomyces avermitilis
<400> 17

tcggcctgcc aacgaac

17

<210> 18
<211> 18
<212> DNA
<213> Streptomyces avermitilis
<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
<212> DNA
<213> Streptomyces avermitilis
<400> 24

gaactggtac cagtgtccc

18



PV2000-2497

60994

P a t e n t o v é n á r o k y

1. Izolovaná polynukleotidová molekula obsahující úplný aveC ORF *S. avermitilis* nebo jeho významnou část, kde tato molekula neobsahuje další úplný ORF, který je umístěn za aveC ORF in situ v chromosomu *S. avermitilis*.
2. Izolovaná polynukleotidová molekula podle nároku 1 obsahující stejnou nukleotidovou sekvenci, jako je kódující sekvence pro AveC genový produkt *S. avermitilis* z plasmidu pSE186 (ATCC 209604), nebo nukleotidovou sekvenci stejnou jako je nukleotidová sekvence aveC ORF podle obr. 1 (SEQ ID NO: 1), nebo její významná část.
3. Izolovaná polynukleotidová molekula podle nároku 2, která dále obsahuje nukleotidové sekvence, které za přirozeného stavu sousedí s aveC genem in situ v *S. avermitilis*.
4. Izolovaná polynukleotidová molekula obsahující nukleotidovou sekvenci, která je homologická ke kódující sekvenci pro AveC genový produkt *S. avermitilis* z plasmidu pSE186 (ATCC 209604), nebo k nukleotidové sekvenci aveC ORF podle obr. 1 (SEQ ID NO: 1), nebo její významné části.
5. Izolovaná polynukleotidová molekula obsahující nukleotidovou sekvenci, která kóduje polypeptid mající aminokyselinovou sekvenci, která je homologická k aminokyselinové sekvenci kodované sekvencí kódující AveC genový produkt *S. avermitilis* z plasmidu pSE186 (ATCC 209604), nebo k aminokyselinové sekvenci podle obr. 1 (SEQ ID NO: 2), nebo její významné části.
6. Izolovaná polynukleotidová molekula obsahující nukleotidovou sekvenci SEQ ID NO: 3 nebo její významnou část, nebo



nukleotidovou sekvenci, která je homologická k nukleotidové sekvenci SEQ ID NO: 3.

7. Izolovaná polynukleotidová molekula obsahující nukleotidovou sekvenci, která kóduje polypeptid, který je homologický k aminokyselinové sekvenci SEQ ID NO: 4.

8. Oligonukleotidová molekula, která hybridizuje na polynukleotidovou molekulu mající nukleotidovou sekvenci podle obr. 1 (SEQ ID NO: 1) nebo SEQ ID NO: 3, nebo na polynukleotidovou molekulu mající nukleotidovou sekvenci, která je komplementární k nukleotidové sekvenci podle obr. 1 (SEQ ID NO: 1) nebo SEQ ID NO: 3, za podmínek vysoké přísnosti.

9. Oligonukleotidová molekula podle nároku 8, která je komplementární k nukleotidové sekvenci podle obr. 1 (SEQ ID NO: 1) nebo SEQ ID NO: 3, nebo k polynukleotidové molekule mající nukleotidovou sekvenci, která je komplementární k nukleotidové sekvenci podle obr. 1 (SEQ ID NO: 1) nebo SEQ ID NO: 3.

10. Rekombinantní vektor v y z n a č u j í c í s e t í m, že obsahuje polynukleotidovou molekulu obsahující nukleotidovou sekvenci vybranou ze skupiny skládající se z:

(a) nukleotidové sekvence, která je stejná jako kódující sekvence pro AveC genový produkt *S. avermitilis* z plasmidu pSE186 (ATCC 209604), nebo která je stejná jako nukleotidová sekvence aveC ORF podle obr. 1 (SEQ ID NO: 1), nebo její významná část;

(b) nukleotidové sekvence, která je homologická ke kódující sekvenci pro AveC genový produkt *S. avermitilis* z plasmidu pSE186 (ATCC 209604), nebo k nukleotidové sekvenci aveC ORF podle obr. 1 (SEQ ID NO: 1), nebo její významné části; a

(c) nukleotidové sekvence, která kóduje polypeptid mající aminokyselinovou sekvenci, která je homologická k aminokyselinové sekvenci kodované kódující sekvenci pro AveC genový produkt *S. avermitilis* z plasmidu pSE186 (ATCC 209604), nebo k aminokyselinové sekvenci podle obr. 1 (SEQ ID NO: 2), nebo její významné části.

11. Rekombinantní vektor podle nároku 10 v y z n a č u j í c í s e t í m, že dále obsahuje nukleotidovou sekvenci kódující jeden nebo více regulačních elementů, kde tato nukleotidová sekvence kódující regulační elementy je v operativní vazbě s nukleotidovou sekvencí podle nároku 10.

12. Rekombinantní vektor podle nároku 11 v y z n a č u j í c í s e t í m, že obsahuje nukleotidovou sekvenci kódující selektovatelný marker.

13. Rekombinantní vektor podle nároku 12 v y z n a č u j í c í s e t í m, že se jedná o plasmid pSE186 (ATCC 209604).

14. Hostitelská buňka v y z n a č u j í c í s e t í m, že obsahuje rekombinantní vektor podle nároku 12.

15. Hostitelská buňka podle nároku 14 v y z n a č u j í c í s e t í m, že jí je *Streptomyces avermitilis*.

16. Rekombinantní vektor v y z n a č u j í c í s e t í m, že obsahuje polynukleotidovou molekulu obsahující nukleotidovou sekvenci vybranou ze skupiny skládající se z nukleotidové sekvence SEQ ID NO: 3 nebo její významné části; nukleotidové sekvence, která je homologická k nukleotidové sekvenci SEQ ID NO: 3; a nukleotidové sekvence, která kóduje polypeptid, který je homologický k aminokyselinové sekvenci SEQ ID NO: 4.

17. Rekombinantní vektor podle nároku 16 v y z n a č u j í c í s e t í m, že dále obsahuje nukleotidovou sekvenci kódující jeden nebo více regulačních elementů, kde tato nukleotidová sekvence kódující regulační elementy je v operativní vazbě s nukleotidovou sekvencí podle nároku 16.
18. Rekombinantní vektor podle nároku 17 v y z n a č u j í c í s e t í m, že obsahuje nukleotidovou sekvenci kódující selektovatelný marker.
19. Hostitelská buňka v y z n a č u j í c í s e t í m, že obsahuje rekombinantní vektor podle nároku 18.
20. Hostitelská buňka podle nároku 19 v y z n a č u j í c í s e t í m, že jí je *Streptomyces hygroscopicus*.
21. Rekombinantně exprimovaný AveC genový produkt *S. avermitilis* mající aminokyselinovou sekvenci kodovanou nukleotidovou sekvencí kódující AveC genový produkt *S. avermitilis* z plasmidu pSE186 (ATCC 209604), nebo aminokyselinovou sekvenci podle SEQ ID NO: 2, nebo její významné části, nebo polypeptid k němu homologický.
22. Rekombinantně exprimovaný genový produkt *S. hygroscopicus* homologický k AveC mající aminokyselinovou sekvenci SEQ ID NO: 4, nebo polypeptid k němu homologický.
23. Způsob přípravy rekombinantního AveC genové produktu v y z n a č u j í c í s e t í m, že obsahuje kultivaci hostitelské buňky transformované rekombinantním expresním vektorem, kde uvedený rekombinantní expresní vektor obsahuje polynukleotidovou molekulu mající nukleotidovou sekvenci

kódující aminokyselinovou sekvenci kodovanou kódující sekvencí pro AveC genový produkt *S. avermitilis* z plasmidu pSE186 (ATCC 209604), nebo kódující aminokyselinovou sekvenci SEQ ID NO: 2 nebo její významnou část, kde tato polynukleotidová molekula je v operativní vazbě s jedním nebo více regulačními elementy, které kontrolují expresi polynukleotidové molekuly v hostitelské buňce, kde tato kultivace je provedena za podmínek umožňujících produkci rekombinantního AveC genového produktu, a získání AveC genového produktu z buněčné kultury.

24. Způsob přípravy rekombinantního produktu genu homologického k AveC v y z n a č u j í c í s e t í m, že obsahuje kultivaci hostitelské buňky transformované rekombinantním expresním vektorem, kde uvedený rekombinantní expresní vektor obsahuje polynukleotidovou molekulu mající nukleotidovou sekvenci kódující aminokyselinovou sekvenci SEQ ID NO: 4 nebo její významnou část, kde tato polynukleotidová molekula je v operativní vazbě s jedním nebo více regulačními elementy, které kontrolují expresi polynukleotidové molekuly v hostitelské buňce, kde tato kultivace je provedena za podmínek umožňujících produkci rekombinantního produktu genu homologického k AveC, a získání AveC genového produktu z buněčné kultury.

25. Polynukleotidová molekula obsahující nukleotidovou sekvenci, která je stejná jako sekvenční kódující AveC genový produkt *S. avermitilis* z plasmidu pSE186 (ATCC 209604) nebo nukleotidová sekvenční aveC ORF *S. avermitilis*, jak je uvedena na obr. 1 (SEQ ID NO: 1) s tou výjimkou, že tato nukleotidová sekvenční dále obsahuje jednu nebo dvě mutace, takže buňky *S. avermitilis* kmene ATCC 53692, ve kterých byla přirozená aveC alela inaktivována a které exprimují polynukleotidovou molekulu obsahující mutovanou nukleotidovou sekvenci, produkují avermektiny v odlišném poměru a množství, než jsou produkovány



buňkami *S. avermitilis* kmene ATCC 53692, které exprimují pouze přirozenou *aveC* alelu.

26. Polynukleotidová molekula podle nároku 25, která ovlivňuje produkci avermektinů tak, že buňky *S. avermitilis* kmene ATCC 53692, ve kterých byla přirozená *aveC* alela inaktivována a které exprimují polynukleotidovou molekulu podle nároku 25, produkují avermektiny ve sníženém poměru třídy 2:třídy 1 ve srovnání s buňkami *S. avermitilis* ATCC 53692, které exprimují pouze přirozenou alelu.

27. Polynukleotidová molekula podle nároku 26, kde avermektiny třídy 2:třídy 1 jsou cyklohexyl-B2:cyklohexyl-B1 avermektiny.

28. Polynukleotidová molekula podle nároku 27, kde snížený poměr cyklohexyl-B2:cyklohexyl-B1 avermektinů je menší než 1,6:1.

29. Polynukleotidová molekula podle nároku 28, kde snížený poměr cyklohexyl-B2:cyklohexyl-B1 avermektinů je přibližně 0,94:1.

30. Polynukleotidová molekula podle nároku 29, kde mutace *S. avermitilis aveC* ORF podle obr. 1 (SEQ ID NO: 1) kóduje aminokyselinovou substituci ve zbytku 139 *AveC* genového produktu z alaninu na threonin.

31. Polynukleotidová molekula podle nároku 28, kde snížený poměr cyklohexyl-B2:cyklohexyl-B1 avermektinů je přibližně 0,88:1.

32. Polynukleotidová molekula podle nároku 31, kde mutace *S. avermitilis aveC* ORF podle obr. 1 (SEQ ID NO: 1) kóduje



aminokyselinovou substituci ve zbytku 138 AveC genového produktu ze serinu na threonin.

33. Polynukleotidová molekula podle nároku 28, kde snížený poměr cyklohexyl-B2:cyklohexyl-B1 avermektinů je přibližně 0,84:1.

34. Polynukleotidová molekula podle nároku 33, kde mutace S. avermitilis aveC ORF podle obr. 1 (SEQ ID NO: 1) kóduje první aminokyselinovou substituci ve zbytku 138 AveC genového produktu ze serinu na threonin a druhou aminokyselinovou substituci ve zbytku 139 AveC genového produktu z alaninu na threonin.

35. Polynukleotidová molekula podle nároku 25, kde mutace S. avermitilis aveC ORF podle obr. 1 (SEQ ID NO: 1) kóduje aminokyselinovou substituci ve zbytku 55 AveC genového produktu ze serinu na fenylalanin.

36. Polynukleotidová molekula podle nároku 25, kde mutace S. avermitilis aveC ORF podle obr. 1 (SEQ ID NO: 1) kóduje aminokyselinovou substituci ve zbytku 230 AveC genového produktu z glycinu na aspartat.

37. Polynukleotidová molekula obsahující silný promotor v operativní vazbě se S. avermitilis aveC ORF podle obr. 1 (SEQ ID NO: 1).

38. Polynukleotidová molekula podle nároku 37, kde silný promotor je ermE promotor ze Saccharopolyspora erythraea.

39. Polynukleotidová molekula obsahující nukleotidovou sekvenci kódující AveC genový produkt, který byl inaktivován insercí



heterologní nukleotidové sekvence do uvedené nukleotidové sekvence.

40. Polynukleotidová molekula podle nároku 25 obsahující aveC alelu, která byla inaktivována delecí 640 bp PstI/SphI fragmentu z aveC ORF podle obr. 1 (SEQ ID NO: 1).

41. Polynukleotidová molekula podle nároku 25 obsahující aveC alelu, která byla inaktivována vložením mutace způsobující posun čtecího rámce do alely.

42. Polynukleotidová molekula podle nároku 41, do které byla vložena mutace způsobující posun čtecího rámce přidáním dvou G nukleotidů po C nukleotidu v nukleotidové pozici 471 aveC ORF podle obr. 1 (SEQ ID NO: 1).

43. Polynukleotidová molekula podle nároku 25 obsahující aveC alelu, která byla inaktivována vložením terminačního kodonu v nukleotidové pozici, která kóduje aminokyselinu 116 AveC genového produktu *S. avermitilis*.

44. Polynukleotidová molekula podle nároku 25 obsahující aveC alelu, která byla inaktivována vložením první mutace v aminokyselinové pozici 256 AveC genového produktu, která mění glycin na aspartat, a druhé mutace v pozici 275 AveC genového produktu, která mění tyrosin na histidin.

45. Genový substituční vektor v y z n a č u j í c í s e t í m, že obsahuje polynukleotidovou molekulu obsahující nukleotidové sekvence, které za přirozeného stavu sousedí s aveC ORF in situ v chromosomu *S. avermitilis*.

46. Rekombinantní vektor v y z n a č u j í c í s e t í m, že obsahuje polynukleotidovou molekulu podle jakéhokoliv z nároků 25 až 44.
47. Rekombinantní vektor obsahující polynukleotidovou molekulu podle nároku 39 v y z n a č u j í c í s e t í m, že jde o vektor pSE180 (ATCC 209605).
48. Hostitelská buňka *Streptomyces* v y z n a č u j í c í s e t í m, že obsahuje rekombinantní vektor podle nároku 46.
49. Způsob pro identifikaci mutací aveC ORF schopných měnit poměr produkovaných avermektinů třídy 2:třídy 1 v y z n a č u j í c í s e t í m, že obsahuje: (a) stanovení poměru avermektinů třídy 2:třídy 1 produkovaných buňkami kmene *S. avermitilis*, ve kterých byla přirozená aveC alela inaktivována a do kterých byla vložena a ve kterých je exprimována polynukleotidová molekula obsahující nukleotidovou sekvenci kódující mutovaný AveC genový produkt; (b) stanovení poměru avermektinů třídy 2:třídy 1 produkovaných buňkami stejného kmene *S. avermitilis* jako v kroku (a), které však exprimují pouze aveC alelu mající nukleotidovou sekvenci ORF podle obr. 1 (SEQ ID NO: 1) nebo nukleotidovou sekvenci homologickou k této sekvenci; a (c) srovnání poměru avermektinů třídy 2:třídy 1 produkovaných buňkami *S. avermitilis* kroku z (a) s poměrem avermektinů třídy 2:třídy 1 produkovaných buňkami *S. avermitilis* z kroku (b), kdy pokud je poměr avermektinů třídy 2:třídy 1 produkovaných buňkami *S. avermitilis* kroku z (a) odlišný od poměru avermektinů třídy 2:třídy 1 produkovaných buňkami *S. avermitilis* z kroku (b), tak byla identifikována mutace aveC ORF schopná měnit poměr avermektinů třídy 2:třídy 1.

50. Způsob podle nároku 49 v y z n a č u j í c í s e t í m, že poměr avermektinů třídy 2:třídy 1 je snížen v důsledku mutace.

51. Způsob pro identifikaci mutací aveC ORF nebo genetických konstruktů schopných měnit množství produkovaných avermektinů v y z n a č u j í c í s e t í m, že obsahuje: (a) stanovení avermektinů produkovaných buňkami kmene *S. avermitilis*, ve kterých byla přirozená aveC alela inaktivována a do kterých byla vložena a ve kterých je exprimována polynukleotidová molekula obsahující nukleotidovou sekvenci kódující mutovaný AveC genový produkt, nebo obsahující genetický konstrukt obsahující nukleotidovou sekvenci kódující AveC genový produkt; (b) stanovení množství avermektinů produkovaných buňkami stejného kmene *S. avermitilis* jako v kroku (a), které však exprimují pouze aveC alelu mající nukleotidovou sekvenci ORF podle obr. 1 (SEQ ID NO: 1) nebo nukleotidovou sekvenci homologickou k této sekvenci; a (c) srovnání množství avermektinů produkovaných buňkami *S. avermitilis* kroku z (a) s množstvím avermektinů produkovaných buňkami *S. avermitilis* z kroku (b), kdy pokud je množství avermektinů třídy produkovaných buňkami *S. avermitilis* kroku z (a) odlišné od množství avermektinů produkovaných buňkami *S. avermitilis* z kroku (b), tak byla identifikována mutace aveC ORF schopná měnit množství avermektinů.

52. Způsob podle nároku 51 v y z n a č u j í c í s e t í m, že množství produkovaných avermektinů je zvýšeno v důsledku mutace.

53. Způsob přípravy nových kmenů *S. avermitilis* obsahujících buňky, které exprimují mutovanou aveC alelu a produkují pozměněný poměr avermektinů třídy 2:třídy 1 ve srovnání

s buňkami stejného kmene *S. avermitilis*, které exprimují pouze přirozenou *aveC* alelu v y z n a č u j í c í s e t í m, že obsahuje transformaci buněk kmene *S. avermitilis* vektorem, který obsahuje mutovanou *aveC* alelu kódující genový produkt, který mění poměr avermektinů třídy 2:třídy 1 produkovaných buňkami kmene *S. avermitilis* exprimujících mutovanou *aveC* alelu ve srovnání s buňkami stejného kmene, které exprimují pouze přirozenou *aveC* alelu, a selekci transformovaných buněk, které produkují avermektiny v pozmeněném poměru třídy 2:třídy 1 ve srovnání s poměrem avermektinů třídy 2:třídy 1 produkovaných buňkami kmene exprimujícího pouze přirozenou alelu.

54. Způsob podle nároku 53 v y z n a č u j í c í s e t í m, že poměr avermektinů třídy 2:třídy 1 je snížen v důsledku mutace.

55. Způsob přípravy nových kmenů *S. avermitilis* obsahujících buňky, které produkují pozmeněné množství avermektinů v y z n a č u j í c í s e t í m, že obsahuje transformaci buněk kmene *S. avermitilis* vektorem, který obsahuje mutovanou *aveC* alelu nebo genetický konstrukt obsahující *aveC* alelu, jehož exprese vede ke změně množství avermektinů produkovaných buňkami kmene *S. avermitilis* exprimujících mutovanou *aveC* alelu nebo genetický konstrukt ve srovnání s buňkami stejného kmene, které exprimují pouze přirozenou *aveC* alelu, a selekci transformovaných buněk, které produkují avermektiny v pozmeněném množství ve srovnání s množstvím avermektinů produkovaných buňkami kmene exprimujícího pouze přirozenou alelu.

56. Způsob podle nároku 55 v y z n a č u j í c í s e t í m, že množství produkovaných avermektinů je zvýšeno v důsledku mutace.

57. Způsob přípravy nových kmenů *S. avermitilis* jejichž buňky obsahující inaktivovanou *aveC* alelu v y z n a č u j í c í s e t í m, že obsahuje transformaci buněk kmene *S. avermitilis* vektorem, který inaktivuje *aveC* alelu, a selekci transformovaných buněk, ve kterých byla *aveC* alela inaktivována.
58. Způsob podle nároku 57 v y z n a č u j í c í s e t í m, že vektorem je pSE 180 (ATCC 209605).
59. Kmen *S. avermitilis* v y z n a č u j í c í s e t í m, že obsahuje buňky exprimující mutovanou *aveC* alelu, což způsobuje produkci avermektinů těmito buňkami v pozměněném poměru třídy 2:třídy 1 ve srovnání s buňkami exprimujícími pouze přirozenou *aveC* alelu.
60. Kmen podle nároku 59 v y z n a č u j í c í s e t í m, že poměr avermektinů třídy 2:třídy 1 je snížen v důsledku mutace.
61. Kmen podle nároku 60 v y z n a č u j í c í s e t í m, že buňky produkují cyklohexyl B2:cyklohexyl B1 avermektiny v poměru menším než 1,6:1.
62. Kmen podle nároku 61 v y z n a č u j í c í s e t í m, že buňky produkují cyklohexyl B2:cyklohexyl B1 avermektiny v poměru menším než 0,94:1.
63. Kmen podle nároku 61 v y z n a č u j í c í s e t í m, že buňky produkují cyklohexyl B2:cyklohexyl B1 avermektiny v poměru menším než 0,88:1.

64. Kmen podle nároku 61 v y z n a č u j í c í s e t í m, že buňky produkují cyklohexyl B2:cyklohexyl B1 avermektiny v poměru menším než 0,84:1.
65. Kmen *S. avermitilis* v y z n a č u j í c í s e t í m, že obsahuje buňky exprimující mutovanou *aveC* alelu nebo genetický konstrukt, což způsobuje produkci avermektinů těmito buňkami ve vyšším množství ve srovnání s buňkami exprimujícími pouze přirozenou *aveC* alelu.
66. Kmen *S. avermitilis* v y z n a č u j í c í s e t í m, že obsahuje buňky, ve kterých byl *aveC* gen inaktivován.
67. Způsob výroby avermektinů v y z n a č u j í c í s e t í m, že obsahuje kultivaci buněk kmene *S. avermitilis*, kde tyto buňky exprimují mutovanou *aveC* alelu kódující genový produkt, který mění poměr avermektinů třídy 2:třídy 1 produkovaných buňkami *S. avermitilis* exprimujícími mutovanou *aveC* alelu ve srovnání s buňkami stejného kmene neexprimujícími mutovanou alelu a exprimujícími pouze přirozenou *aveC* alelu, v kultivačním mediu za podmínek umožňujících nebo indukujících produkci avermektinů těmito buňkami, a získání uvedených avermektinů z kultury.
68. Způsob podle nároku 67 v y z n a č u j í c í s e t í m, že poměr avermektinů třídy 2:třídy 1 je snížen v důsledku mutace.
69. Způsob výroby avermektinů v y z n a č u j í c í s e t í m, že obsahuje kultivaci buněk kmene *S. avermitilis*, kde tyto buňky exprimují mutovanou *aveC* alelu nebo genetický konstrukt obsahující *aveC* alelu, které mění množství avermektinů produkovaných buňkami *S. avermitilis* exprimujícími

mutovanou aveC alelu nebo genetický konstrukt ve srovnání s buňkami stejného kmene neexprimujícími mutovanou alelu či genetický konstrukt a exprimujícími pouze přirozenou aveC alelu, v kultivačním mediu za podmínek umožňujících nebo indukujících produkci avermektinů těmito buňkami, a získání uvedených avermektinů z kultury.

70. Způsob podle nároku 69 v y z n a č u j í c í s e t í m, že množství produkovaných avermektinů je zvýšeno v důsledku exprese mutované aveC alely nebo genetického konstruktu.

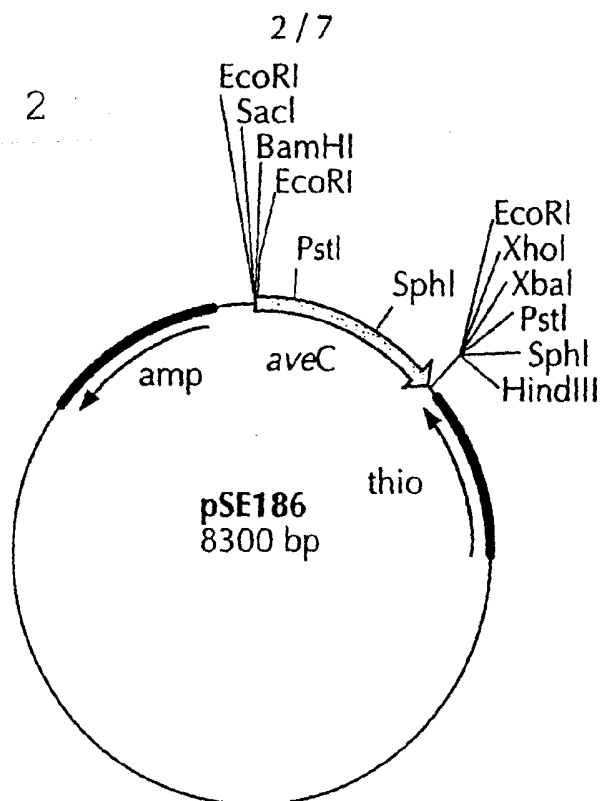
71. Přípravky obsahující avermektiny produkované buňkami kmene *S. avermitilis*, kde tyto buňky exprimují mutovanou aveC alelu kódující genový produkt, který snižuje poměr avermektinů třídy 2:třídy 1 produkovaných buňkami *S. avermitilis* exprimujícími mutovanou aveC alelu ve srovnání s buňkami stejného kmene neexprimujícími mutovanou alelu a exprimujícími pouze přirozenou aveC alelu, kde avermektiny jsou produkovány ve sníženém poměru třídy 2:třídy 1 ve srovnání s poměrem avermektinů třídy 2:třídy 1 produkovaným buňkami stejného kmene *S. avermitilis* neexprimujícími mutovanou aveC alelu a exprimujícími pouze přirozenou aveC alelu.

~~60994~~

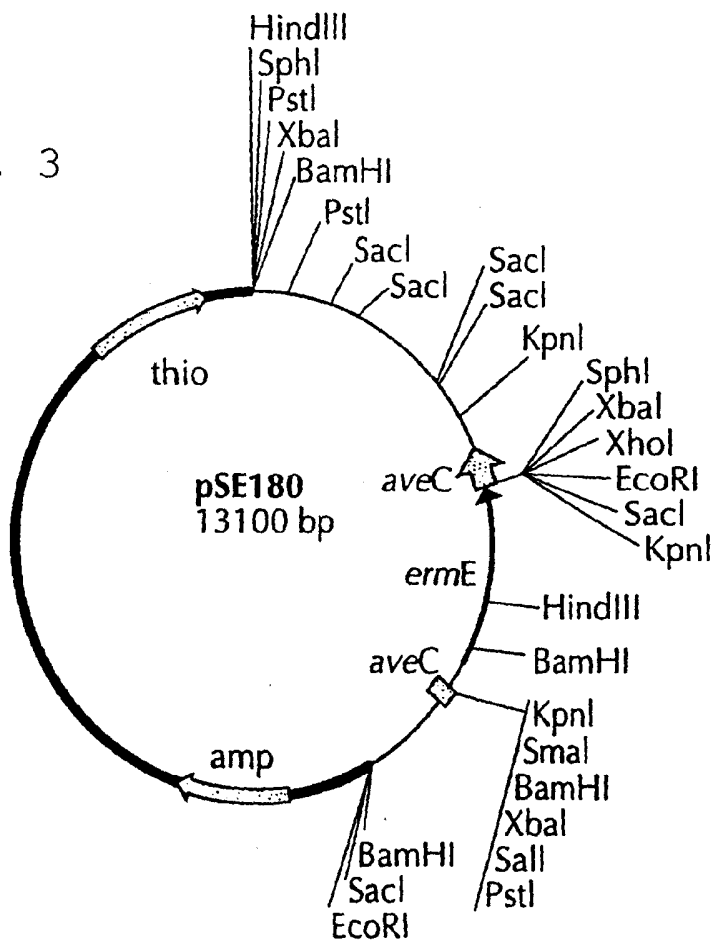
Obv. 1

29.08.00

Obr. 2

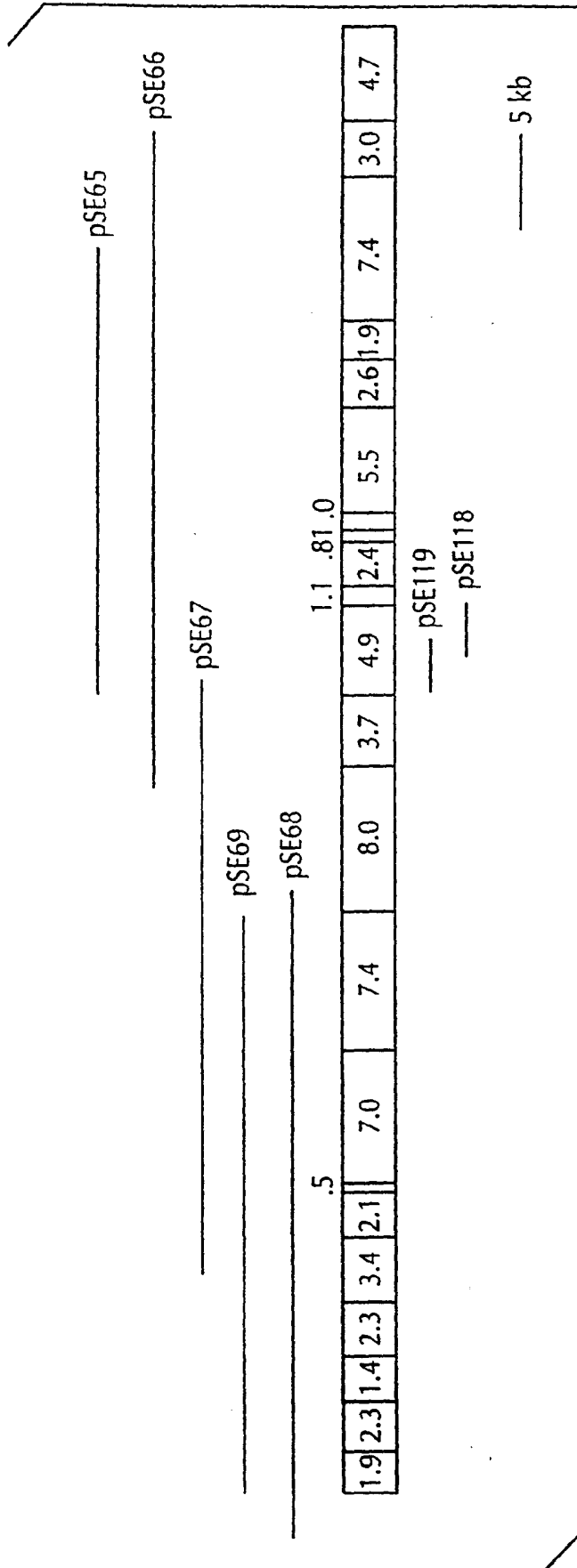


Obr. 3



200800

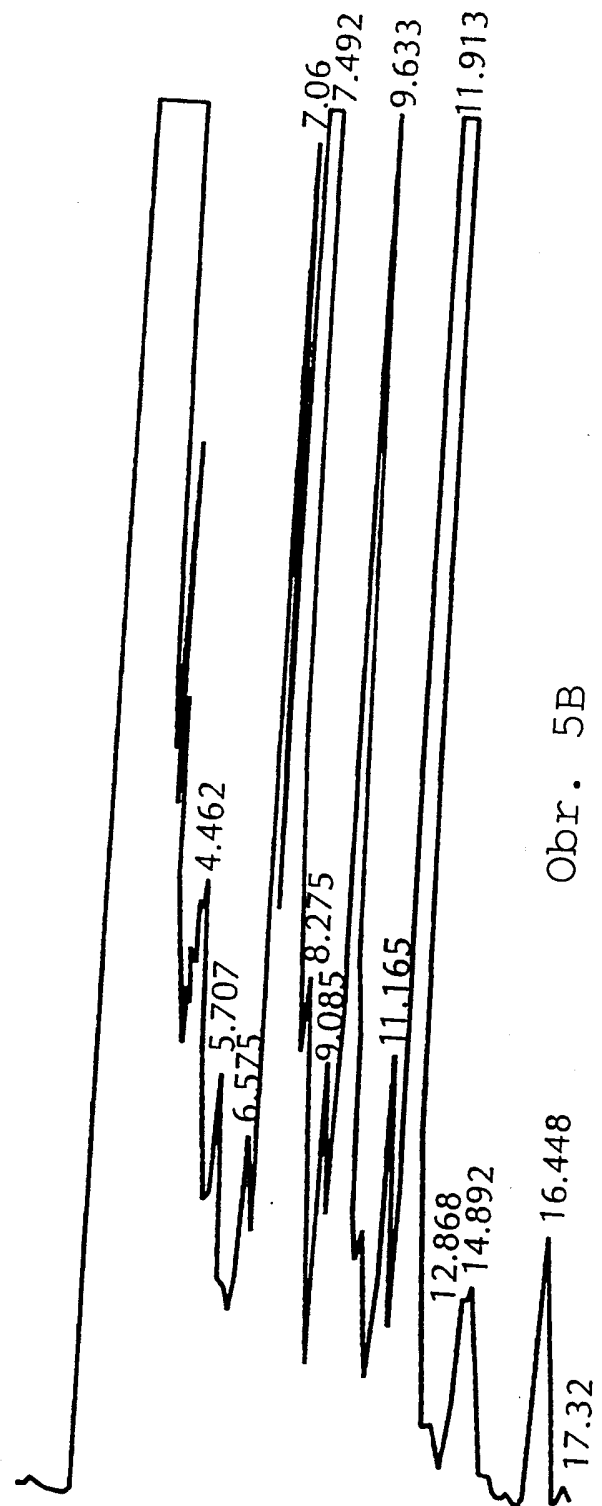
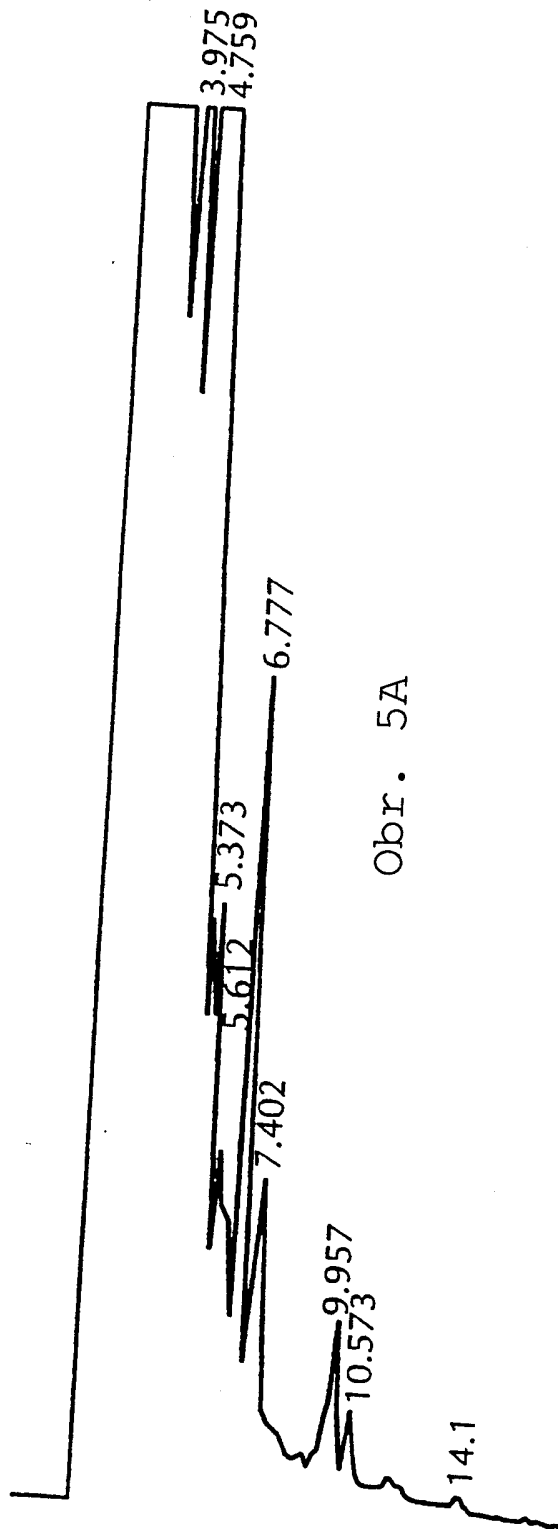
3/7



Obr. 4

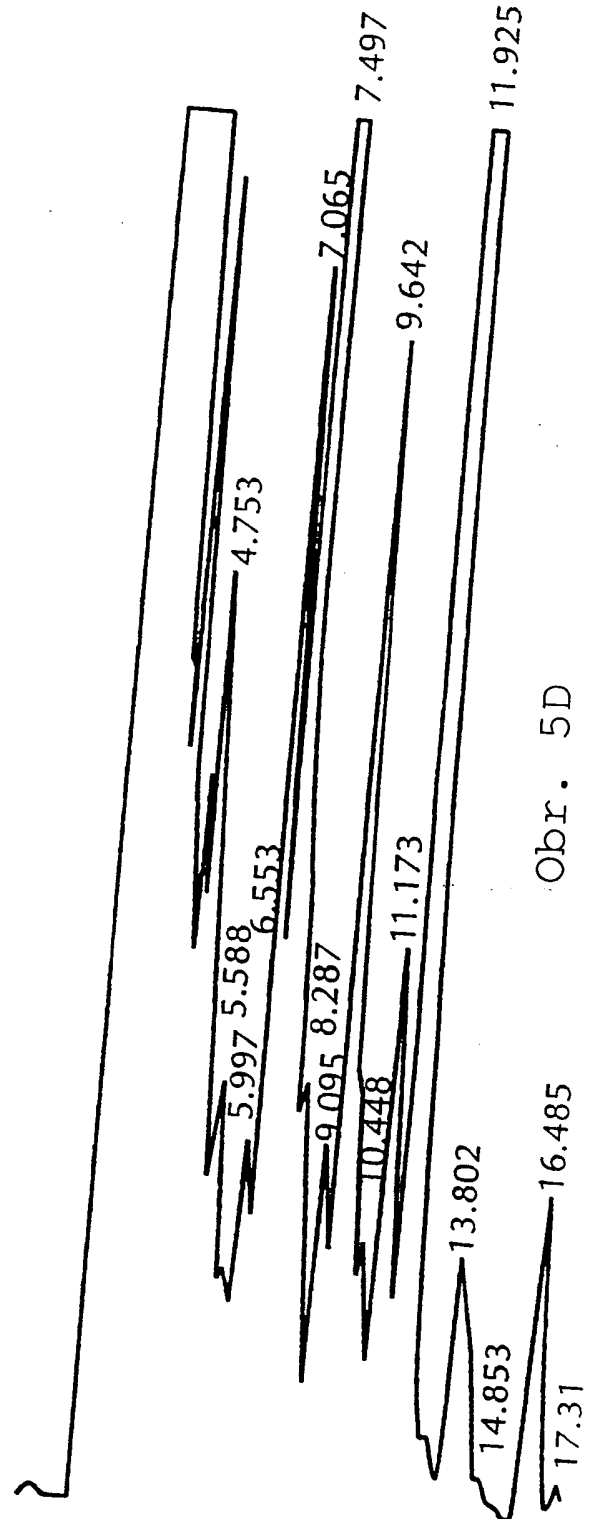
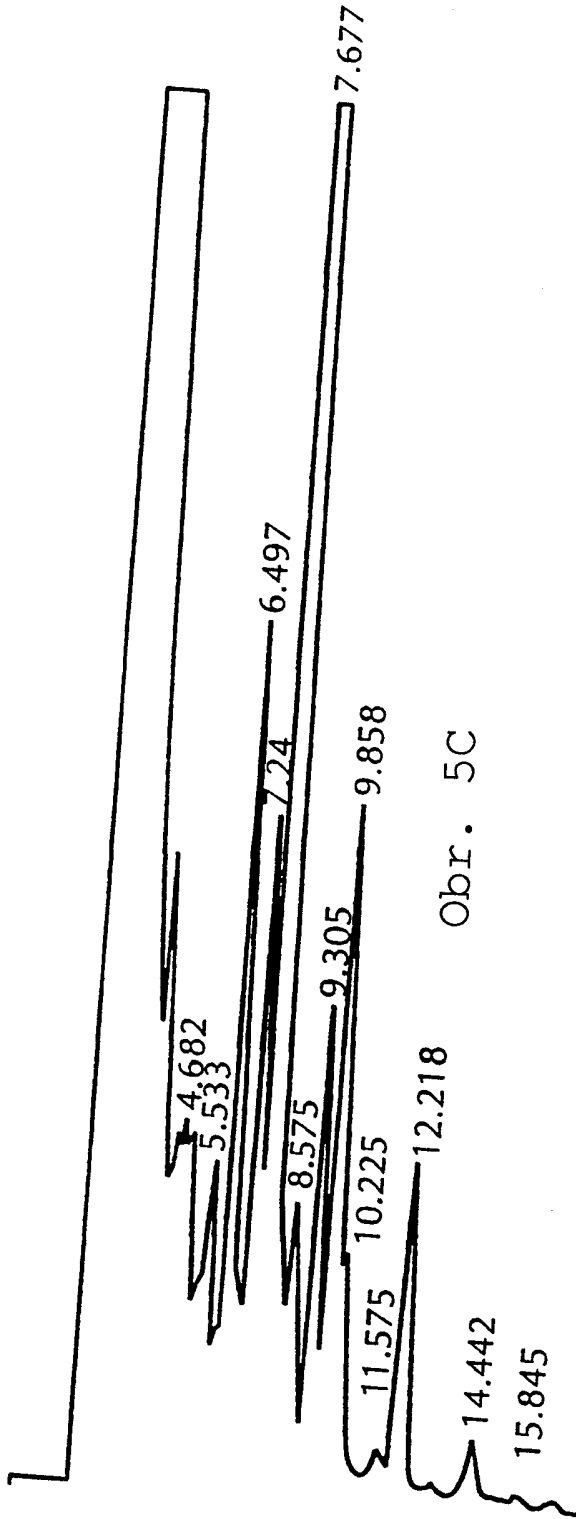
200800

4/7



2000

5/7



20.00.00

6/7

Obr. 6

S. ave
S. gri
S. hyg VFTLP
Cons -----

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

51 100
S. ave YPVISVVCIT AAAAWLFERRC 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

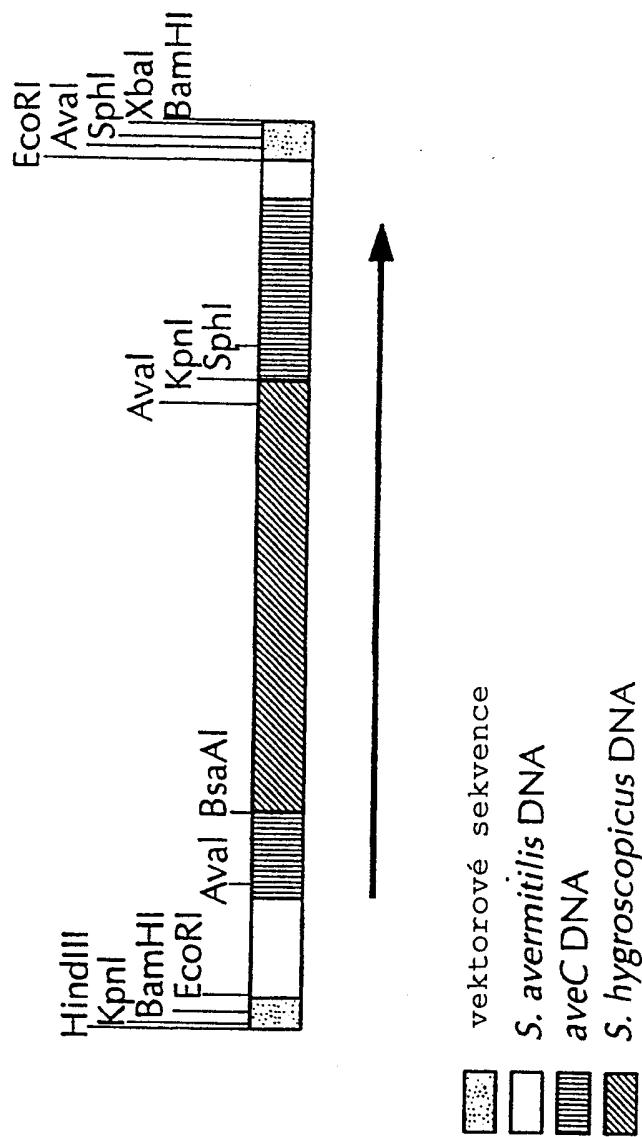
101 150
S. ave SVLVSNASVW GAVGSWGPYV PGWQGAGPGA EAEMPLASAS VCMSALIVTV
S. gri PVLMANTHVW GAVGSWGPYV PGWRGLPPGK EAELPLVTFS LGSTVLLGVL
S. hyg PVLASNPNVF GAVASWGPYV PGWQGAGAHQ EAELPLATLS ICMTAMMAAV
Cons pVL-sN--Vw GAVgSWGPYV PGWqGagpg- EAELPLat-S -cmtal---v

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

201 250
S. ave LPEVTIWSGE WYQFPVYQAV GSGLVCCMLG SLRFFRDERD ESWVERGAWR
S. gri LPTVTIWRGA 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 QAPAAAY*
S. gri -----
S. hyg RPAAGY*
Cons ---a-y



Obr. 7