

(11) Número de Publicação: **PT 1476539 E**

(51) Classificação Internacional:  
**C12N 1/21** (2007.10)

**(12) FASCÍCULO DE PATENTE DE INVENÇÃO**

---

(22) Data de pedido: **2003.01.31**

(30) Prioridade(s): **2002.02.12 US 356222 P**

(43) Data de publicação do pedido: **2004.11.17**

(45) Data e BPI da concessão: **2009.03.31**  
**070/2009**

(73) Titular(es):

**PFIZER PRODUCTS INC.**  
**EASTERN POINT ROAD GROTON,**  
**CONNECTICUT 06340** US

(72) Inventor(es):

**YAN CHEN** US  
**KIM J. STUTZMAN-ENGWALL** US  
**CLAES ERIC DANIEL GUSTAFSSON** US  
**ANKE KREBBER** US  
**SUN AI RAILLARD** US

(74) Mandatário:

**ALBERTO HERMÍNIO MANIQUE CANELAS**  
**RUA VÍCTOR CORDON, 14 1249-103 LISBOA** PT

(54) Epígrafe: **GENE STREPTOMYCES AVERMITILIS QUE DIRIGE A PROPORÇÃO DE  
AVERMECTINAS B2:B1**

(57) Resumo:

## RESUMO

"GENE STREPTOMYCES AVERMITILIS QUE DIRIGE  
A PROPORÇÃO DE AVERMECTINAS B2:B1"

O presente invento relaciona-se com moléculas de polinucleótido compreendendo sequências de nucleótidos codificando um produto gene aveC, cujas moléculas de polinucleótido podem ser usadas para alterar a proporção ou quantidade da classe 2:1 de avermectinas produzida em culturas de fermentação de *S. avermitilis*. O presente invento relaciona-se ainda com vectores, células hospedeiras, e estirpes mutantes de *S. avermitilis* em que o gene aveC tenha sido inactivado, ou submetido a mutação de modo a modificar a proporção ou quantidade de avermectina da classe 2:1 produzida.

**DESCRIÇÃO**

**"GENE STREPTOMYCES AVERMITILIS QUE DIRIGE  
A PROPORÇÃO DE AVERMECTINAS B2:B1"**

**1. CAMPO DO INVENTO**

O presente invento é dirigido a composições e métodos para a produção eficiente de avermectinas tais como "doramectina", que são principalmente úteis no campo da saúde animal. Mais particularmente, o presente invento relaciona-se com moléculas de polinucleótido compreendendo sequências de nucleótido codificando um produto de gene AveC, o qual pode ser usado para modular a proporção de avermectinas de classe 2:1 produzidas por culturas de fermentação de *Streptomyces avermitilis*. O presente invento relaciona-se ainda com vectores, células do hospedeiro transformadas, e novas estirpes mutantes de *S. avermitilis* em que o gene aveC tenha sido submetido a mutação de modo a modular a proporção de avermectinas de classe 2:1 produzidas.

**FUNDAMENTOS DO INVENTO**

**2.1 Avermectinas**

As espécies *Streptomyces* produzem uma ampla

variedade de metabolitos secundários, incluindo as avermectinas, que compreendem uma série de oito lactonas macrocíclicas com dezasseis membros afins apresentando potente actividade anti-helmíntica e insecticida. Os oito compostos distintos mas intimamente relacionados são referidos como A1a, A1b, A2a, A2b, B1a, B2a e B2b. A série "a" de compostos refere-se à avermectina natural onde o substituinte na posição C25 é (S)-sec-butilo, e a série "b" refere-se aos compostos onde o substituinte na posição C25 é isopropilo. As designações "A" e "B" referem-se a avermectinas onde o substituinte na posição C5 é metoxi e hidroxi, respectivamente. O número "1" refere-se a avermectinas onde esteja presente uma dupla ligação na posição C22,23, e o número "2" refere-se a avermectinas tendo um hidrogénio na posição C22 e um hidroxi na posição C23. De entre as avermectinas afins, o tipo B1 de avermectina, tal como doramectina, é reconhecido com possuindo a actividade antiparasitária e pesticida mais eficaz, sendo assim a avermectina comercialmente mais desejável.

As avermectinas e a sua produção por fermentação aeróbica de estirpes de *S. avermitilis* são descritas nas Patentes dos E.U.A. Nos. 4.310.519 e 4.429.042. Pensa-se que a biossíntese de avermectinas naturais seja iniciada endogenamente a partir dos análogos de tioéster CoA de ácido isobutírico e ácido S-(+)-2-metil butírico.

Uma combinação tanto da melhoria da estirpe

através de mutagenese aleatória como a utilização de ácidos gordos fornecidos exogenamente levou à produção eficiente de análogos da avermectina. Mutantes de *S. avermitilis* que sejam deficientes em deshidrogenase de ácido 2-oxo de cadeia ramificada (mutantes deficientes em bkd) podem apenas produzir avermectinas quando as fermentações sejam suplementadas com ácidos gordos. Passagem por crivo e isolamento de mutantes deficientes em actividade de deshidrogenase de cadeia ramificada (por exemplo, *S. avermitilis*, ATCC 53567) são descritos na Patente Europeia (EP) 276103. A fermentação desses mutantes na presença de ácidos gordos fornecidos de um modo exógeno dá origem à produção de apenas as quatro avermectinas correspondendo ao ácido gordo utilizado. Assim, a suplementação de fermentações de *S. avermitilis* (ATCC 53567) com ácido S- $(+)$ -2-metilbutírico dá origem à produção das avermectinas naturais A1a, A2a, B1a e B2a; fermentações de suplementação com ácido isobutírico dão origem à produção das avermectinas naturais A1b, A2b, B1b, e B2b; e fermentações de suplementação com ácido ciclopantanocarboxílico dão origem à produção das quatro novas ciclopentilavermectinas A1, A2, B1 e B2.

Se forem suplementadas com outros ácidos gordos, produzir-se-ão novas avermectinas. Ao rastrear 800 precursores potenciais, foram identificadas mais de 60 outras novas avermectinas. (Ver, por exemplo, Dutton et al., 1991, *J. Antibiot.* 44:357-365; e Banks et al., 1994, *Roy. Soc. Chem.* 147:16-26). Além disso, mutantes de *S.*

*avermitilis* deficientes em actividade de 5-O-metiltransferase produzem essencialmente apenas as avermectinas análogas B. Consequentemente, mutantes de *S. avermitilis* a que faltem tanto a deshidrogenase do ácido 2-oxo de cadeia ramificada como a actividade da 5-O-metiltransferase produzem apenas as avermectinas B correspondendo ao ácido gordo utilizado para suplementar a fermentação. Assim, a suplementação desses duplos mutantes com ácido S-(+)-2-metilbutírico dá origem à produção de apenas as avermectinas naturais B1a e B2a, enquanto que a suplementação com ácido isobutírico ou com ácido ciclopantanocarboxílico dá origem à produção das avermectinas naturais B1b e B2b ou das novas avermectinas ciclopentil B1 e B2, respectivamente. A suplementação da estirpe de mutação dupla com ácido ciclo-hexano carboxílico constitui um método preferido para a produção da nova avermectina comercialmente importante, ciclo-hexilavermectina B1 (doramectina). O Isolamento e características desses duplos mutantes, por exemplo *S. avermitilis* (ATCC 53692), é descrito em EP 276103.

## **2.2. Genes Envolvidos Na Biossíntese De Avermectina**

Em muitos casos, genes envolvidos na produção de metabolitos secundários e genes codificando um antibiótico particular são encontrados formando clusters entre si no cromossoma. Isso acontece com o cluster de gene sintase de genes sintase poliquetido *Streptomyces* (PKS) (ver Hopwood and Sherman, 1990, Ann. Rev. Genet. 24:37-66). Assim, uma

estratégia para clonar genes numa via biossintética consistiu em isolar um gene de resistência a droga e em seguida testar regiões adjacentes do cromossoma quanto a outros genes relacionados com a biossíntese desse antibiótico particular. Uma outra estratégia para clonar genes envolvidos na biossíntese de metabolitos importantes consistiu na complementação de mutantes. Por exemplo, porções de uma biblioteca de DNA a partir de um organismo capaz de produzir um metabolito particular são introduzidas num mutante não-produtor e transformantes rastreados para produção de metabolitos. Adicionalmente, a hibridização de uma biblioteca usando sondas derivadas de outras espécies de *Streptomyces* foi usada para identificar e clonar genes em vias biossintéticas.

Genes envolvidos na biossíntese de avermectina (genes ave), tal como os genes requeridos para biossíntese de outros metabolitos secundários de *Streptomyces* (por exemplo, PKS), são encontrados formando clusters no cromossoma. Um certo número de genes ave foram clonados com sucesso usando vectores para complementar mutantes de *S. avermitilis* bloqueados na biossíntese de avermectina. A clonagem desses genes é descrita na Patente dos E.U.A. No. 5.252.474. Além disso, Ikeda et al., 1995, *J. Antibiot.* 48:532-534, descreve a localização de uma região cromossómica envolvendo o passo de desidratação (aveC) até um fragmento *Bam*HI 4,82 Kb de *S. avermitilis*, assim como mutações no gene aveC que dão origem à produção de um único produtor de componente B2a. Como a ivermectina, um potente

composto anti-helmíntico, pode ser produzida quimicamente a partir de avermectina B2a, um tal único produtor de avermectina B2a é considerado como sendo particularmente útil para produção comercial de ivermectina.

A Patente dos E.U.A. No. 6.248.579 por Stutzman-Engwall et al., publicada em 19 de Junho de 2001, descreve certas mutações para o gene *aveC* de *Streptomyces avermitilis* levando a uma redução na proporção ciclo-hexil B2:ciclo-hexil B1 até uma proporção de cerca de 0,75:1.

A Publicação PCT WO 01/12821 por Pfizer Products Inc., publicada em 22 de Fevereiro de 2001, descreve certas mutações adicionais para o gene *aveC* de *Streptomyces avermitilis* levando a posteriores reduções na proporção entre ciclo-hexil B2:ciclo-hexil B1 até 0,40:1.

A identificação de mutações adicionais ou de combinações de mutações no gene *aveC* que ainda minimizam mais a complexidade da produção de avermectina, tal como, por exemplo, mutações que diminuam mais a proporção B2:B1 de avermectinas, iria simplificar a produção e purificação de avermectinas comercialmente importantes.

#### **SUMÁRIO DO INVENTO**

O presente invento proporciona uma molécula de polinucleótido compreendendo uma sequência de nucleótidos que é por outro lado igual ao alelo de *aveC* de *Streptomyces*

*avermitilis*, a sequência que codifica o produto gene AveC de *S. avermitilis* de plasmídeo pSE186 (ATCC 209604) ou a sequência de nucleótidos do ORF aveC de *S. avermitilis* tal como é apresentada na FIGURA 1 (SEQ ID NO:1), ou uma sua variante degenerada, mas cuja sequência de nucleótidos compreende ainda mutações que codificam uma combinação de substituições de aminoácido em resíduos de aminoácidos correspondendo às posições de aminoácidos de SEQ ID NO:2, de modo a que as células de *S.avermitilis* da estirpe ATCC 53692 em que o alelo aveC do tipo selvagem tenha sido inactivado e que expresse a molécula de polinucleótido compreendendo a sequência de nucleótidos com mutação sejam capazes de produzir uma proporção da classe 2:1 de avermectinas que seja reduzida em comparação com a proporção produzida por células da estirpe *S. avermitilis* ATCC 53692 que pelo contrário expressam apenas o alelo aveC do tipo selvagem, em que que quando as avermectinas da classe 2:1 são avermectinas ciclo-hexil B2:ciclo-hexil B1, a proporção das avermectinas da classe 2:1 seja de 0,35:1 ou menor. Numa forma de realização mais preferida, a proporção entre avermectinas ciclo-hexil B2:ciclo-hexil B1 é de cerca de 0,30:1 ou inferior. Numa forma de realização mais preferida, a proporção entre avermectinas ciclo-hexil B2:ciclo-hexil B1 é de cerca de 0,25:1 ou inferior. Numa forma de realização mais preferida, a proporção entre avermectinas ciclo-hexil B2:ciclo-hexil B1 é de cerca de 0,20:1 ou inferior.

Numa sua forma de realização particular, a

combinação de substituições de aminoácido compreende uma combinação seleccionada de entre o grupo consistindo em:

- (a) D48E, A61T, A89T, S138T, A139T, G179S, A198G, P289L;
- (b) G40S, D48E, L136P, G179S, E238D;
- (c) D48E, L136P, R163Q, G179S;
- (d) D48E, L136P, R163Q, G179S, E238D;
- (e) D48E, L136P, R163Q, A200G, E238D;
- (f) D48E, L136P, G179S, E238D;
- (g) D48E, A61T, L136P, G179S, E238D;
- (h) D48E, A61T, L136P, G179S;
- (i) D48E, A89T, S138T, A139T, G179S;
- (j) D48E, A61T, L136P, G179S, A198G, P202S, E238D, P289L;
- (k) D48E, A61T, L136P, S138T, A139F, G179S, E238D, P289L;
- (l) D48E, L136P, G179S, A198G, E238D, P289L;
- (m) D48E, A61T, S138T, A139F, G179S, A198G, P289L;
- (n) D48E, L84P, G111V, S138T, A139T, G179S, A198G, P289L;
- (o) Y28C, D48E, A61T, A89T, S138T, A139T, G179S, E238D;
- (p) D48E, A61T, A107T, S108G, L136P, G179S, S192A, E238D, (q) P289L;
- (r) D48E, L136P, G179S, R250W;
- (s) D48E, A89T, S138T, A139T, R163Q, G179S;
- (t) D48E, L136P, G179S, A198G, P289L;
- (u) D48E, F78L, A89T, L136P, G179S;
- (v) D48E, A89T, S138T, A139T, G179S, E238D, F278L;

- (w) D48E, A89T, L136P, R163Q, G179S;
- (x) D48E, A61T, A89T, G111V, S138T, A139F, G179S, E238D, P289L;
- (y) D25G, D48E, A89T, L136P, S138T, A139T, V141A, I159T, R163Q, G179S;
- (z) D48E, A89T, S90G, L136P, R163Q, G179S, E238D; D48E, A61T, A89T, G111V, S138T, A139T, G179S, E238D, P289L;
- (aa) D48E, A89T, S138T, A139T, G179S;
- (ab) D84E, L136P, R163Q, G179S, S231L;
- (ac) D48E, L136P, S138T, A139F, G179S, V196A, E238D;
- (ad) D48E, A61T, A89T, F99S, S138T, A139T, G179S, E238D;
- (ae) G35S, D48E, A89T, S138T, A139T, G179S, P289L;
- (af) D48E, A61T, A89T, S138T, A139T, G179S, V196A, E238D;
- (ag) D48E, A89T, G111T, S138T, A139T, G179S, A198G, E238D;
- (ah) S41G, D48E, A89T, L136P, G179S;
- (ai) D48E, A89T, L136P, R163Q, G179S, P252S;
- (aj) D48E, A89T, L136P, G179S, F234S;
- (ak) D48E, A89T, L136P, R163Q, G179S, E238D;
- (al) Q63R, D48E, A89T, L136P, G179S, E238D;
- (am) D48E, A89T, L136P, R163Q, G179S;
- (an) D48E, A89T, S138T, G179S;
- (ao) D48E, A89T, L136P, G179S, E238D;
- (ap) D48E, A89T, L136P, K154E, G179S, E238D;
- (aq) D48E, A89T, S138T, A139T, K154R, G179S, V196A, P289L;
- (ar) D48E, A89T, S138T, A139F, G179S, V196A, E238D;

(as) D48E, A61T, A89T, L136P, G179S, V196A, A198G, P289L;

(at) D48E, A61T, S138T, A139F, G179S, G196A, E238D, P289L;

(au) D48E, A89T, L136P, G179S;

(av) D48E, A89T, V120A, L136P, G179S;

(aw) D48E, A61T, A89T, S138T, A139F, G179S, V196A, A198G, E238D;

(ax) D48E, A61T, A89T, G111V, S138T, A139F, G179S, V196A, E238D;

(ay) D48E, A61T, A89T, S138T, A139T, G179S, V196A, E238D, P289L;

(az) D48E, A61T, A89T, L136P, S138T, A139F, G179S, A198G, E238D;

(ba) D48E, A89T, S138T, A139F, G179S, A198G, V220A; D48E, A61T, A89T, S138T, A139T, G179S, V196A, E238D, R239H, P289L;

(bc) D48E, A61T, A89T, L136P, G179S, P289L;

(bd) D48E, A89T, S138T, A139T, G179S, V196A, E238D, P289L; e

(be) D48E, A61T, A89T, S138T, A139F, G179S, V196A, E238D.

O presente invento proporciona ainda uma molécula de polinucleótido compreendendo uma sequência de nucleótidos que é por outro lado a mesma que o alelo *aveC* de *Streptomyces avermitilis*, a sequência codificando produto AveC de *S. avermitilis* de plasmídeo pSE 186 (ATCC 209604) ou a sequência de nucleótidos do ORF *aveC* de *S.*

*avermitilis* tal como está presente na FIGURA 1 (SEQ IDNO:1), ou uma sua variante degenerada, mas cuja sequência de nucleótidos comprehende ainda mutações codificando uma combinação de substituições de resíduos de aminoácidos correspondendo às posições de aminoácido de SEQ ID NO:2, de modo a que as células de *S. avermitilis* da estirpe ATCC 53692 em que o alelo aveC do tipo selvagem tenha sido inactivado e que expresse uma molécula de polinucleótido comprehendendo a sequência de nucleótidos submetida a mutação seja capaz de produzir uma proporção 2:1 de avermectinas que seja reduzida em comparação com a proporção produzido por células da estirpe *S. avermitilis* ATCC 53692 que como alternativa expresse apenas o alelo aveC do tipo selvagem em que quando a classe de avermectinas 2:1 seja constituida por avermectinas ciclohexil B2:ciclo-hexil B1, a proporção das avermectinas da classe 2:1 seja reduzido até cerca de 0,40:1 ou inferior, e em que a combinação de substituições de aminoácido comprehenda uma combinação seleccionada de entre o grupo consistindo em:

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

O presente invento proporciona ainda um vector recombinante comprehendendo uma molécula de polinucleótido do presente invento.

O presente invento proporciona ainda uma célula

hospedeiro compreendendo uma molécula de polinucleótidos ou um vector recombinante do presente invento. Numa forma de realização preferida, a célula hospedeiro é uma célula de *Streptomyces*. Numa forma de realização mais preferida, a célula hospedeira é uma célula de *Streptomyces avermitilis*.

O presente invento proporciona ainda um método para produzir uma nova estirpe de *Streptomyces avermitilis*, compreendendo (i) mutação do alelo *aveC* numa célula de um estirpe de *S. avermitilis*, cuja mutação dá origem a uma combinação de substituições de aminoácido no produto gene *AveC*, ou (ii) introduzindo para uma célula de uma estirpe de *S. avermitilis* um alelo *aveC* submetido a mutação ou uma sua variante degenerada codificando um produto gene *AveC* compreendendo uma combinação de substituições de aminoácido, em que a combinação de substituições de aminoácido é seleccionada de entre (a) até (b) acima indicados.

O presente invento proporciona ainda um método para produzir uma nova estirpe de *Streptomyces avermitilis*, compreendendo (i) mutação do alelo *aveC* numa célula de uma estirpe de *S. avermitilis*, cuja mutação dá origem a uma combinação de substituições de aminoácido no produto gene *AveC*, ou (ii) introduzindo numa célula de uma estirpe de *S. avermitilis* um alelo *aveC* submetido a mutação ou uma sua variante degenerada codificando um produto gene *AveC* compreendendo uma combinação de substituições de aminoácido, em que células compreendendo o alelo *aveC* submetido a mutação ou uma sua variante degenerada sejam capazes de

produzir avermectinas ciclo-hexil B2:ciclo-hexil B1 numa proporção de 0,35:1 ou inferior. Numa sua forma de realização não limitativa, o alelo *aveC* submetido a mutação ou uma sua variante degenerada codifica um produto gene *AveC* compreendendo uma combinação de substituições de aminoácido seleccionada de entre o grupo consistindo em (a) a (b) acima indicados.

Numa sua forma de realização preferida, a proporção de avermectinas ciclo-hexil B2:ciclo-hexil B1 é de cerca de 0,30:1 ou inferior. Numa forma de realização não limitativa, o alelo *aveC* ou uma sua variante degenerada codifica um produto gene *AveC* compreendendo uma combinação de substituições de aminoácido seleccionada de entre o grupo consistindo em de (f) a (be) acima indicados.

Numa sua forma de realização preferida. A proporção de avermectinas ciclo-hexil B2:ciclo-hexil B1 é de cerca de 0,25:1 ou inferior. Numa forma de realização não limitativa, o alelo *aveC* submetido a mutação ou uma sua variante degenerada codifica um produto gene *AveC* compreendendo uma combinação de substituições de aminoácido seleccionada de entre o grupo consistindo em de (w) a (be) acima indicados.

Numa sua forma de realização mais preferida, a proporção de avermectinas ciclo-hexil B2:ciclo-hexil B1 é de cerca de 0,20:1 ou inferior. Numa forma de realização não limitativa, o alelo *aveC* submetido a mutação ou uma sua

variante degenerada codifica um produto gene AveC compreendendo uma combinação de substituições de aminoácido seleccionada de entre o grupo consistindo em de (ao) a (be) acima indicados.

O presente invento proporciona ainda um método para produzir uma nova estirpe de *Streptomyces avermitilis*, compreendendo (I) mutação do alelo aveC numa célula de uma estirpe de *S. avermitilis*, cuja mutação dá origem a uma combinação de substituições de aminoácido no produto gene AveC, ou (ii) introduzindo numa célula de uma estirpe de *S. avermitilis* um alelo aveC submetido a mutação ou uma sua variante degenerada codificando um produto gene AveC compreendendo uma combinação de substituições de aminoácido, em que a combinação de substituições de aminoácido é seleccionada de entre o grupo consistindo em (bf) e (bg) acima indicados. Numa sua forma de realização preferida, células de *S. avermitilis* compreendendo esse alelo aveC submetido a mutação ou uma sua variante degenerada são capazes de produzir avermectinas ciclo-hexil B2:ciclo-hexil B1 numa proporção de cerca de 0,40:1 ou inferior.

O presente invento proporciona ainda uma célula de uma espécie de *Streptomyces* que compreende um alelo aveC de *S. avermitilis* submetido a mutação ou uma sua variante degenerada codificando um produto gene AveC compreendendo uma combinação de substituição de aminoácido seleccionada de entre (a) a (be) acima indicados. Numa sua forma de realização preferida, a espécie de *Streptomyces* é *S. avermitilis*.

O presente invento proporciona ainda uma célula de *Streptomyces avermitilis* capaz de produzir avermectinas ciclo-hexil B2:ciclo-hexil B1 numa proporção de 0,35:1 ou inferior. Numa sua forma de realização não limitativa, a célula comprehende um alelo aveC submetido a mutação ou uma sua variante degenerada codificando um produto gene AveC compreendendo uma combinação de substituições de aminoácido seleccionada de entre o grupo consistindo em de (a) a (be) acima indicados.

Numa sua forma de realização preferida, a proporção de avermectinas ciclo-hexil B2:ciclo-hexil B1 é de cerca de 30:1 ou inferior. Numa sua forma de realização não limitativa, as células comprehendem um alelo aveC submetido a mutação ou uma sua variante degenerada codificando um produto gene AveC compreendendo uma combinação de substituições de aminoácido seleccionada de entre o grupo consistindo em de (f) a (be) acima indicados.

Numa sua forma de realização mais preferida, a proporção de avermectinas ciclo-hexil B2:ciclo-hexil B1 é de cerca de 0,25:1 ou inferior. Numa sua forma de realização não limitativa, as células comprehendem um alelo aveC submetido a mutação ou uma sua variante degenerada codificando um produto gene AveC compreendendo uma combinação de substituições de aminoácido seleccionada de entre o grupo consistindo em de (w) a (be) acima indicados.

Numa sua forma de realização mais preferida, a proporção de avermectinas ciclo-hexil B2:ciclo-hexil B1 é de cerca de 0,20:1 ou inferior. Numa sua forma de realização não limitativa, as células compreendem um alelo *aveC* submetido a mutação ou uma sua variante degenerada codificando um produto gene AveC compreendendo uma combinação de substituições de aminoácido seleccionada de entre o grupo consistindo em de (ao) a (be) acima indicados.

O presente invento proporciona ainda uma espécie de *Streptomyces*, compreendendo um alelo *aveC* de *S. avermitilis* ou uma sua variante degenerada codificando um produto gene AveC compreendendo uma combinação de substituições de aminoácido seleccionada de entre o grupo consistindo em (bf) e (bg) acima indicados. Numa sua forma de realização preferida, a espécie de *Streptomyces* é *S. avermitilis*. Numa forma de realização mais preferida, a célula é uma célula de *S. avermitilis* capaz de produzir avermectinas ciclo-hexil B2:ciclo-hexil B1 numa proporção de cerca de 0,40:1 ou inferior.

O presente invento proporciona ainda um processo para a produção de avermectinas, compreendendo a cultura de uma estirpe de células de *Streptomyces avermitilis* do presente invento em meio de cultura em condições que permitam ou induzam a produção de avermectinas a partir dela, e recuperando as referias avermectinas a partir da cultura.

O presente invento proporciona ainda uma composição de avermectinas ciclo-hexil B2:ciclo-hexil B1 produzidas por células de *Streptomyces avermitilis*, compreendendo as avermectinas ciclo-hexil B2:ciclo-hexil B1 presentes num meio de cultura em que as células tenham sido cultivadas, em que a proporção de avermectinas ciclo-hexil B2:ciclo-hexil B1 presente no meio de cultura seja de 0,35:1 ou inferior, de preferência de cerca de 0,30:1 ou inferior, com maior preferência cerca de 0,25:1 ou inferior, e com maior preferência cerca de 0,20:1 ou inferior. Numa forma de realização particular, a composição de avermectinas ciclo-hexil B2:ciclo-hexil B1 é produzida por células de uma estirpe de *S. avermitilis* que expressa um alelo *aveC* submetido a mutação ou uma sua variante degenerada que codifica um produto gene que dá origem à redução da proporção da classe 2:1 de avermectinas ciclo-hexil B2:ciclo-hexil B1 produzido pelas células em comparação com células da mesma estirpe de *S. avermitilis* que não expressam o alelo *aveC* submetido a mutação mas em vez disso expressam apenas o alelo *aveC* do tipo selvagem.

Numa sua forma de realização preferida, onde a composição é constituída por avermectinas ciclo-hexil B2:ciclo-hexil B1 numa proporção de 0,35:1 ou inferior, a composição é produzida por células compreendendo um alelo *aveC* submetido a mutação ou uma sua variante degenerada codificando um produto gene *AveC* compreendendo uma combinação de substituições de aminoácido seleccionada de entre o grupo consistindo em de (a) a (be) acima indicados.

Numa outra sua forma de realização preferida, onde a composição é constituida por avermectinas ciclohexil B2:ciclo-hexil B1 numa proporção de cerca de 0,30:1 ou inferior, a composição é produzida por células compreendendo um alelo aveC submetido a mutação ou uma sua variante degenerada codificando um produto gene AveC compreendendo uma combinação de substituições de aminoácido seleccionada de entre o grupo consistindo em de (f) a (be) acima indicados.

Numa outra sua forma de realização preferida, onde a composição é constituida por avermectinas ciclohexil B2:ciclo-hexil B1 numa proporção de cerca de 0,25:1 ou inferior, a composição é produzida por células compreendendo um alelo aveC submetido a mutação ou uma sua variante degenerada codificando um produto gene AveC compreendendo uma combinação de substituições de aminoácido seleccionada de entre os grupos consistindo em de (w) a (be) acima indicados.

Numa outra sua forma de realização preferida, onde a composição é constituida por avermectinas ciclohexil B2:ciclo-hexil B1 numa proporção de 0,20:1 ou inferior, a composição é produzida por células compreendendo um alelo aveC submetido a mutação ou uma sua variante degenerada codificando um produto gene AveC compreendendo uma combinação de substituições de aminoácido seleccionada de entre o grupo consistindo em de (ao) a (be) acima indicados.

O presente invento proporciona ainda uma composição constituída por avermectinas ciclo-hexil B2:ciclo-hexil B1 produzidas por células de *Streptomyces avermitilis*, compreendendo as avermectinas ciclo-hexil B2:ciclo-hexil B1 presentes num meio de cultura em que as células tenham sido cultivadas, em que a proporção de avermectinas ciclo-hexil B2:ciclo-hexil B1 presentes no meio de cultura seja de cerca de 0,40:1 ou inferior, e produzidas por células compreendendo um alelo *aveC* submetido a mutação ou uma sua variante degenerada codificando um produto gene *AveC* compreendendo uma combinação de substituições de aminoácido seleccionada de entre o grupo consistindo em (bf) e (bg) acima indicados.

**DESCRICAÇÃO RESUMIDA DAS FIGURAS**

FIGURA 1. Sequência de DNA (SEQ ID NO:1) compreendendo ORF *aveC* *S. avermitilis*, e sequência de aminoácido deduzida (SEQ ID NO:2)

FIGURA 2. Vector de plasmídeo pSE186 (ATCC 209604) compreendendo a totalidade de ORF do gene *aveC* de *S. avermitilis*.

FIGURA 3. Vector de substituição de gene pSE180 (ATCC 209605) compreendendo o gene *ermE* de *Sacc. erythraea* inserido no ORF *aveC* de *S. avermitilis*.

FIGURA 4. Mapa de restrição *Bam*HI do cluster de gene de sintase poliquetido de avermectina a partir de *S. avermitilis* com cinco clones cosmidios sobrepostos identificados (isto é, pSE65, pSE66, pSE67, pSE68, pSE69). A relação de pSE118 e pSE119 é também indicada.

FIGURA 5. Análise por HPLC de produtos de fermentação produzidos por estirpes de *S. avermitilis*. A quantificação de pico foi realizada por comparação com quantidades padrão de ciclo-hexil B1. O tempo de retenção de ciclo-hexil B2 foi de 7,4-7,7 minutos; o tempo de retenção de ciclo-hexil B1 foi de 11,9-12,3 minutos. FIG. 5A Estirpe de *S. avermitilis* SE180-11 com um ORF *aveC* inactivado. FIG. 5B. estirpe de *S. avermitilis* SE180-11 transformado com pSE187. FIG. 5D. Estirpe de *S. avermitilis* SE180-11 transformado com pSE188.

FIGURA 6A-M. Lista combinada de combinações de substituições de aminoácido codificada por mutações com o alelo *aveC* tal como foi identificado por uma segunda volta de "rearranjo de gene", e seus efeitos sobre a proporção de produção de ciclo-hexil B2:ciclo-hexil B1. Para cada plasmídeo, na coluna com o título "Mutações", a caixa superior indica as substituições de aminoácido, e a caixa inferior indica as modificações da base de nucleótido que dão origem a essas substituições de aminoácido. As modificações da base de nucleótido em parênteses são modificações silenciosas, isto é, não dão origem a modificações para a sequência de aminoácidos.

**Descrição Detalhada do Invento**

O presente invento relaciona-se com a identificação e caracterização de moléculas de polinucleótido apresentando sequências de nucleótidos que codificam o produto gene AveC a partir de *Streptomyces avermitilis*, a construção de novas estirpes de *S. avermitilis* que podem ser usadas para rastrear produtos de gene AveC submetido a mutação quanto ao seu efeito sobre a produção de avermectina, e a descoberta de que certos produtos de gene AveC submetido a mutação pode reduzir a proporção de avermectinas B2:B1 produzidas por *S. avermitilis*. A título de exemplo, o invento é descrito nas secções mais abaixo para uma molécula de polinucleótido tendo quer uma sequência de nucleótido que é igual à sequência de codificação do produto gene AveC de *S. avermitilis* de plasmídeo pSE186 (ATCC 209604), quer a sequência de nucleótidos do ORF da FIGURA 1 (SEQ ID NO:1), e para moléculas de polinucleótidos apresentando sequências de nucleótidos deles derivados e suas variantes degeneradas. Contudo, os princípios indicados no presente invento podem ser aplicados de um modo análogo a outras moléculas de polinucleótidos, incluindo genes de homólogo aveC a partir de outra espécie de *Streptomyces*, por exemplo, *S. hygroscopicus* e *S. griseochromogenes*, entre outros.

**Moléculas de Polinucleótido Codificando o Produto Gene AveC  
De *S. avermitilis***

O presente invento proporciona uma molécula

isolada de polinucleótido compreendendo o ORF *aveC* completo de *S. avermitilis* ou uma sua porção substancial, a cuja molécula isolada de polinucleótido falta o ORF completo seguinte que está localizado para baixo a partir do ORF *aveC* *in situ* no cromossoma de *S. avermitilis*.

A molécula isolada de polinucleótido do presente invento compreende de preferência uma sequência de nucleótidos que é igual à sequência que codifica o produto gene AveC de *S. avermitilis* de plasmídeo pSE186 (ATCC 209604), ou que é igual à sequência de nucleótido do ORF da FIGURA 1 (SEQ ID NO:1) ou uma sua porção substancial. Tal como é aqui usada, uma "porção substancial" de uma molécula isolada de polinucleótido compreendendo uma sequência de nucleótido codificando o produto gene AveC de *S. avermitilis* significa uma molécula isolada de polinucleótido compreendendo pelo menos cerca de 70% da sequência ORF *aveC* completa apresentada na FIGURA 1 (SEQ ID NO:1), e que codifica um produto gene AveC funcionalmente equivalente. A este respeito, um produto gene AveC "funcionalmente equivalente" é definido como um produto gene que, quando expresso na estirpe ATCC 53692 de *S. avermitilis* em que o alelo *aveC* nativo tenha sido inactivado, dá origem à produção de uma proporção e quantidade de avermectinas substancialmente iguais às avermectinas produzidas por estirpe de *S. avermitilis* ATCC 53692 que em alternativa expressa apenas o alelo nativo *aveC* funcional, do tipo selvagem para a estirpe *S. avermitilis* ATCC 53692.

Para além da sequência de nucleótidos do ORF *aveC*, a molécula isolada de polinucleótido do presente invento pode ainda compreender sequências de nucleótidos que naturalmente flanqueam o gene *aveC* *in situ* no *S. avermitilis*, tais como as que flanqueiam sequências de nucleótidos apresentadas na FIGURA 1 (SEQ ID NO:1).

O presente invento proporciona ainda uma molécula isolada de polinucleótido compreendendo a sequência de nucleótido de SEQ ID NO:1 ou uma sua variante degenerada, tendo como base a degenerescência conhecida do código genético.

Tal como são aqui usados, os termos "molécula de polinucleótido," "sequência de polinucleótidos," "esquema de abertura aberta," e "ORF" pretendem referir-se às moléculas tanto de DNA como de RNA, que podem ter hélice simples ou hélice dupla, e que podem ser (DNA) transcritos e traduzidos, ou (RNA) traduzido, para um produto gene AveC, ou para um polipeptideo que seja homólogo para um produto gene AveC num sistema de expressão de célula hospedeira apropriada quando colocado sob o controlo de elementos reguladores apropriados. Uma sequência de codificação pode incluir mas não se limita a sequências procariontes, sequências cDNA, sequências de DNA genómicas, e sequências de DNA e de RNA sintetizadas quimicamente.

A sequência de nucleótidos apresentada na FIGURA

1 (SEQ ID NO:1)compreende quatro codões GTG diferentes em posições bp 42, 174, 177 e 180. Tal como foi previamente descrito na Patente dos E.U.A. No. 6.248.579, múltiplas deleções da região 5' do ORF *aveC* (FIGURA 1; SEQ ID NO.:1)foram construídas para ajudar a definir qual dos codões poderia funcionar no *aveC* ORF como sítios de partida para expressão proteica. A deleção do primeiro sítio GTG a bp 42 não elimina a actividade AveC. Deleção adicional de todos os codões GTG nas posições bp 174, 177 e 180 em conjunto eliminaram a actividade de AveC, indicando que esta região é necessária para expressão proteica. O presente invento abrange assim ORFs *aveC* de amplitude variável.

O presente invento proporciona ainda uma molécula de polinucleótido tendo uma sequência de nucleótidos que é homologa em relação à sequência que codifica o produto gene AveC de *S. avermitilis* de plasmídeo pSE186 (ATCC 209604), ou em relação à sequência de nucleótidos do ORF *aveC* apresentado na FIGURA 1 (SEQ ID NO:1) ou uma sua porção substancial. O termo "homólogo" quando usado para se referir a uma molécula de polinucleótido que seja homóloga em relação a uma sequência que codifica produto gene AveC de *S. avermitilis* significa uma molécula de polinucleótido tendo uma sequência de polinucleótidos: (a) que codifique o mesmo produto gene AveC tal como a sequência de codificação de produto gene AveC de *S. avermitilis* de plasmídeo pSE186 (ATCC 209504), ou que codifique o mesmo produto gene AveC que a sequência de nucleótidos do ORF *aveC* apresentado na

FIGURA 1 (SEQ ID NO:1), mas que inclua uma ou mais modificações silenciosas de acordo com a degenerescência do código genético (isto é, uma variante degenerada); ou (b) que hibridize para o complemento de uma molécula de polinucleótido tendo uma sequência de nucleótidos que codifique a sequência de aminoácido codificada pela sequência de codificação de produto gene AveC do plasmídeo pSE186 (ATCC 209604) ou que codifique a sequência de aminoácidos apresentada na FIGURA 1 (SEQ ID NO:2) em condições moderadamente rigorosas, isto é, hibridização para DNA ligado por filtração em  $\text{NaHPO}_4$  0,5 M, sulfato de dodecilo de sódio (SDS) a 7%, EDTA 1 mM a 65° C, e lavagem em 0,2xSSC/0,1% SDS a 42° C (ver Ausubel *et al.* (eds.), 1989, Current Protocols in Molecular Biology, Vol. 1, Green Publishing Associates, Inc., e John Wiley & Sons, Inc., New York, na p. 2.10.3), e codifica um produto gene AveC funcionalmente equivalente tal como foi acima definido. Numa forma de realização preferida, a molécula de polinucleótido homólogo hibridiza para o complemento da sequência de nucleótidos que codifica o produto gene AveC de plasmídeo pSE186 (ATCC 209604) ou para o complemento da sequência de nucleótidos do aveC ORF apresentado na FIGURA 1 (SEQ ID NO:1) ou uma sua porção substancial em condições altamente rigorosas, isto é, hibridização para DNA ligado por filtração em  $\text{NaHPO}_4$  0,5 M, SDS a 7%, EDTA 1 mM a 65° C, e lavagem em 0,1xSSC/0,1% SDS a 68° C (Ausubel *et al.*, 1989, acima referido), e codifica um produto gene AveC funcionalmente equivalente, tal como foi acima definido.

A actividade de um produto gene AveC e de seus equivalentes funcionais potenciais pode ser determinada através de análise HPLC de produtos de fermentação, tal como será descrito nos exemplos apresentados mais abaixo. Moléculas de polinucleótido tendo sequências de nucleótido que codificam equivalentes funcionais do gene AveC de *S. avermitilis* podem incluir genes AveC que ocorram naturalmente presentes noutras estirpes de *S. avermitilis*, com genes aveC homólogos presentes noutras espécies de *Streptomyces*, e sofrendo mutação com alelos aveC, quer ocorrendo naturalmente quer ocorrendo por engenharia.

O presente invento proporciona ainda uma molécula de polipeptídeo compreendendo uma sequência de nucleótidos que codifica um polipeptídeo tendo uma sequência de aminoácidos que seja homóloga em relação à sequência de aminoácidos codificada pela sequência que codifica produto gene AveC de plasmídeo pSE186 (ATCC 209604), ou a sequência de aminoácido da FIGURA 1 (SEQ ID NO:2) ou sua porção substancial. Tal como é aqui usada "porção substancial" da sequência de aminoácidos da FIGURA 1 (SEQ ID NO:2) significa um polipeptídeo compreendendo pelo menos cerca de 70% da sequência de aminoácidos apresentada na FIGURA 1 (SEQ ID NO:2), e que constitui um produto gene AveC funcionalmente equivalente, tal como foi acima definido.

Tal como é aqui usado para se referir a sequências de aminoácido que sejam homólogas em relação à sequência de aminoácidos de um produto gene AveC de *S.*

*avermitilis*, o termo "homólogo" refere-se a um polipeptídeo o qual de outro modo tem a sequência de aminoácidos da FIGURA 1 (SEQ ID NO:2), mas em que um ou mais resíduos de aminoácido tenha(m) sido substituído(s) de um modo moderado com um resíduo de aminoácido diferente, em que a sequência de aminoácidos tem pelo menos cerca de 70%, com maior preferência pelo menos cerca de 80%, e com a maior preferência pelo menos cerca de 90% de identidade de sequência de aminoácidos para o polipeptídeo codificado pela sequência que codifica o produto gene AveC de plasmídeo pSE186 (ATCC 209604) ou a sequência de aminoácidos da FIGURA 1 (SEQ ID NO:2) tal como é determinado por qualquer algoritmo de identidade de sequência de aminoácidos padrão, tal como o algoritmo BLASTP (GENBANK, NCBI), e onde essa substituição moderada dá origem a um produto gene funcionalmente equivalente, tal como foi acima definido. Substituições moderadas de aminoácido são bem conhecidas nesta técnica. Regras para fazer essas substituições incluem as descritas por Dayhof, M.D., 1978, Nat. Biomed. Res. Found., Washington, D.C., Vol. 5, Sup. 3, entre outros. Mais especificamente, substituições moderadas de aminoácido são aquelas que geralmente têm lugar numa família de aminoácidos que estão relacionados com a acidez ou com a polaridade. Amino ácidos codificados geneticamente são geralmente divididos em quatro grupos: (1) acídico = aspartato, glutamato; (2) básico = lisina, arginina, histidina; (3) não polar = alanina, valina, leucina, isoleucina, prolina, fenilalanina, metionina, triptofan; e (4) polar não carregado =

glicina, asparagina, glutamina, cisteina, serina, treonina, tirosina. Fenilalanina, triptofan e tirosina são também classificados em conjunto como aminoácidos aromáticos. Uma ou mais substituições em qualquer grupo particular, por exemplo, de uma leucina com uma isoleucina ou valina, ou de um aspartato com um glutamato, ou de uma treonina com uma serina, ou de qualquer outro resíduo de aminoácido com um resíduo de aminoácido estruturalmente afim, por exemplo, um resíduo de aminoácido com acidez ou polaridade semelhante, ou com semelhança nalguma sua combinação, terão geralmente um efeito insignificante sobre a função do polipeptideo.

A produção e manipulação das moléculas de polinucleótido aqui apresentadas são evidentes para qualquer especialista nesta técnica e podem ser realizadas de acordo com técnicas recombinantes descritas, por exemplo, em Maniatis, et al., 1989, Molecular Cloning, A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY; Ausubel, et al., 1989, Current Protocols In Molecular Biology, Greene Publishing Associates & Wiley Interscience, NY; Sambrook, et al., 1989, Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 2d ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY; Innis et al., (eds), 1995, PCR Strategies, Academic Press, Inc., San Diego; e Erlich (ed), 1992, PCR Technology, Oxford University Press, New York, sendo todos eles aqui incorporados como referência. Clones de polinucleótido codificando produtos de gene homólogo AvcC podem ser identificados usando qualquer método conhecido nesta

técnica, incluindo mas não se limitado aos métodos indicados na Secção 7, mais abaixo. Bibliotecas de DNA genómico podem ser rastreadas para *aveC* e sequências de codificação homóloga de *aveC* usando técnicas tais como os métodos indicados em Benton and Davis, 1977, *Science* 196:180, para bibliotecas bacteriofágas, e em Grunstein and Hogness, 1975, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 72:3961-3965, para bibliotecas de plasmídeos. Moléculas de polinucleótidos tendo sequências de nucleótidos conhecidas por incluirem ORF *aveC*, como é evidente, por exemplo, em plasmídeo pSE186 (ATCC 209604), ou em plasmídeo pSE119 (descrito na Secção 7, mais abaixo), podem ser usadas como sondas nessas experimentações de rastreio. De um modo alternativo, podem ser sintetizadas sondas de oligonucleótidos que correspondem a sequências de nucleótidos deduzidas a partir de sequências de aminoácidos parciais ou completas do produto gene homólogo *AveC* purificado.

**Sistemas Recombinantes****Clonagem E Vectores de Expressão**

O presente invento proporciona ainda vectores de clonagem recombinante e vectores de expressão que são úteis na clonagem ou expressão de moléculas de polinucleótidos do presente invento, compreendendo, por exemplo, o ORF *aveC* de *S. avermitilis* ou qualquer ORFs homólogo *aveC*. Numa forma de realização não limitativa, o presente invento proporciona plasmídeo pSE186 (ATCC 209604), que compreende o ORF completo do gene *aveC* de *S. avermitilis*.

Toda a descrição que se segue no que se refere a ORF *aveC* de *S. avermitilis*, ou uma molécula de polinucleótido compreendendo o ORF *aveC* de *S. avermitilis* ou sua porção, ou um produto gene AveC de *S. avermitilis*, também se refere a alelos *aveC* com mutação tal como é descrito mais abaixo, a não ser que seja indicado de um modo explícito ou por contexto.

Foi desenvolvida uma série de diferentes vectores para utilização específica em *Streptomyces*, incluindo fago, plasmídeos com elevado número de cópias, plasmídeos com baixo número de cópias, e vectores de vai-vem de *E.coli*-*Streptomyces*, entre outros, e qualquer um destes poderá ser usado para realizar o presente invento. Um certo número de genes de resistência a droga foi também clonado a partir de *Streptomyces*, e vários destes genes foram incorporados para vectores como marcadores que se possam seleccionar. São apresentados exemplos de vectores correntes para utilização em *Streptomyces*, entre outros locais, em Hutchinson, 1980, Applied Biochem. Biotech. 16:169-190.

Vectores recombinantes do presente invento, particularmente vectores de expressão, são de preferência construídos de modo a que a sequência de codificação para a molécula de polinucleótido do invento se encontre em associação operativa com um ou mais elementos reguladores necessários para transcrição e translação da sequência de codificação para produzir um polipeptídeo. Tal como é aqui

usado, o termo "elemento regulador" inclui mas não se limita a sequências de nucleótidos que codificam promotores induzíveis e não induzíveis, agentes que melhorem, operadores e outros elementos conhecidos nesta técnica que servem para conduzir e/ou regular a expressão das sequências de codificação do polinucleótido. Também, tal como é aqui usada, a sequência de codificação encontra-se em "associação operativa" com um ou mais elementos reguladores onde os elementos reguladores regulam efectivamente e permitem a transcrição da sequência de codificação ou a translação do seu mRNA, ou ambos.

Vectores de plasmídeo típicos que podem ser submetidos a engenharia para conterem uma molécula de polinucleótido do presente invento incluem pCR-Blunt, pCR2.1 (Invitrogen), pGEM3zf (promega), e o vector de translação pWHN3 (Vara *et al.*, 1989, *J. Bact.* 171:5872-5881), entre muitos outros.

São bem conhecidos métodos nesta técnica para a construção de vectores recombinantes contendo sequências de codificação particulares em associação operativa com elementos reguladores apropriados, e estes podem ser usados para praticar o presente invento. Estes métodos incluem técnicas recombinantes *in vitro*, técnicas sintéticas, e recombinação genética *in vivo*. Ver, por exemplo, as técnicas descritas em Maniatis *et al.*, acima referidos; Ausubel *et al.*, 1989, acima referidos Sambrook *et al.*, 1989, acima referidos; Innis *et al.*, 1995, acima referidos; e Erlich, 1992, acima referido.

Os elementos reguladores destes vectores podem variar na sua intensidade e especificidades. Dependendo do sistema hospedeiro/vector utilizado, poderão ser usados quaisquer uns de um certo número de elementos de transcrição e de translação. Exemplos não limitativos de regiões ou promotores reguladores transcripcionais para bactérias incluem o promotor  $\beta$ -gal, o promotor T7, o promotor TAC, promotores  $\lambda$  esquerdos e direitos, promotores trp e lac, promotores de fusão trp-lac e, mais especificamente para *Streptomyces*, os promotores *ermE*, *meIC*, e *tipA*, etc. Numa forma de realização específica, poderá ser gerado um vector de expressão que contenha o ORF *aveC* ou o seu ORF submetido a mutaçãoclonado adjacente a um promotor constitutivo forte, tal como o promotor *ermE* a partir de *Saccharopolyspora erythraea*. Tal como foi descrito na Patente dos E.U.A. No. 6.248.579, um vector compreendendo o promotor *ermE* foi transformado em *S. avermitilis*, e subsequentemente análise HPLC de produtos de fermentação indicou um título aumentado de avermectinas produzidas em comparação com a produção pela mesma estirpe a qual pelo contrário expressa apenas o alelo *aveC* do tipo selvagem.

Vectores de expressão de proteína de fusão podem ser usados para expressar uma proteína de fusão de produto gene AveC. A proteína de fusão purificada pode ser usada para aumentar antíseros contra o produto gene AveC, para estudar as propriedades bioquímicas do produto gene AveC,

para obter por engenharia proteínas de fusão AveC com diferentes actividades bioquímicas, ou para ajudar na identificação ou purificação do produto gene AveC expressado. Vectores de expressão de proteína de fusão possíveis incluem mas não se limitam a vectores incorporando sequências que codificam  $\beta$ -galactosidase e fusões trpE, fusões de maltose-proteína de ligação, fusões de glutationa-S transferase e fusões de poli-histidina (regiões de transporte). Numa forma de realização alternativa, um produto gene AveC ou uma sua porção poderão ser fundidos com um produto gene homólogo AveC, ou uma sua porção, derivada de outras espécies ou estirpe de *Streptomyces*, tais como, por exemplo, *S. hygroscopicus* ou *S. griseochromogenes*. Esses vectores híbridos podem ser transformados em células de *S. avermitilis* e testados para determinar o seu efeito, por exemplo, na avermectina produzida com proporção da classe 2:1.

Proteínas de fusão AveC podem ser submetidas a engenharia para compreender uma região útil para purificação. Por exemplo, fusões de AveC-maltose-proteína de ligação podem ser purificados usando resina de amilose; proteínas de fusão AveC-glutationa-S-transferase podem ser purificadas usando pérolas de glutationa-agarose; e fusões AveC-poli-histidina podem ser purificadas usando resina de níquel divalente. De um modo alternativo, anticorpos contra uma proteína ou peptídeo veículo podem ser usados para purificação por cromatografia de afinidade da proteína de fusão. Por exemplo, uma codificação de sequência de

nucleótido para o epítopo alvo de um anticorpo monoclonal pode ser submetido a engenharia para o vector de expressão em associação operativa com os elementos reguladores e situados para que o epítopo expresso seja fundido com o polipeptideo AveC. Por exemplo, uma codificação de sequência de nucleótido para a etiqueta de epítopo FLAG™ (International Biotechnologies Inc.), que é um peptideo marcador hidrofílico, pode ser inserida por meio de técnicas padrão no vector de expressão num ponto correspondendo, por exemplo, ao término carboxilo do polipeptideo AveC. O produto de fusão epítopo polipeptideo-FLAG™ pode então ser detectado e purificado por afinidade usando anticorpos anti-FLAG™ disponíveis.

O vector de expressão codificando a proteína de fusão AveC pode também ser submetida a engenharia para conter sequências de poliligação que codificam sítios de clivagem de protease específica de modo a que o polipeptideo AveC expressado possa ser libertado a partir da região veículo ou parceiro de fusão por tratamento com uma protease específica. Por exemplo, o vector da proteína da fusão pode incluir sequências de DNA codificando trombina ou sítios de clivagem de factor Xa, entre outros.

Uma sequência sinal a montante de, e numa grelha de leitura com, o ORF aveC pode ser submetido a engenharia para o vector de expressão por métodos conhecidos para dirigir o transito e secreção do produto gene expresso. Exemplos não limitativos de sequências de sinal incluem as

de factor  $\alpha$ , imunoglobulinas, proteínas membranares exteriores, penicilinase, e receptores de células T, entre outras.

Para ajudar a selecção de células hospedeiras transformadas ou transfectadas com vectores de clonagem ou de expressão do presente invento, o vector pode ser submetido a engenharia para compreender ainda uma sequência de codificação para um produto gene reporter ou outro marcador que se possa seleccionar. Uma tal sequência de codificação encontra-se de preferência em associação operativa com as sequências de codificação do elemento regulador, tal como foi acima descrito. Genes reporter que são úteis no invento são bem conhecidos nesta técnica e incluem os que codificam proteína fluorescente verde, luciferase, xyIE, e tirosinase, entre outros. Marcadores que podem ser seleccionados que codificam sequências de nucleótidos são bem conhecidos nesta técnica, e incluem os que codificam produtos gene conferindo resistência a antibióticos ou anti-metabolitos, ou que fornecem um requerimento auxotrófico. Exemplos dessas sequências incluem as que codificam resistência a eritromicina, tiostrepton ou kanamicina, entre muitos outros.

#### **Transformação De Células Hospedeiras**

O presente invento proporciona ainda células hospedeiras transformadas compreendendo uma molécula de polinucleótido ou vector recombinante do invento, e novas

estirpes ou linhagens celulares deles derivados. Células hospedeiras úteis na prática do invento são de preferência células de *Streptomyces*, embora possam também ser usadas outras células procariontes ou eucariontes. Essas células hospedeiras transformadas incluem tipicamente mas não se limitam a microorganismos, tais como bactérias transformadas com DNA de bacteriofago recombinante, vectores de DNA de plasmídeo ou de DNA de cosmídeo, ou levedura transformada com vectores recombinantes, entre outros.

Pretende-se que as moléculas de polinucleótido do presente invento funcionem em células de *Streptomyces*, mas podem também ser transformadas noutras células de bactérias ou eucariontes, por exemplo, tendo como finalidade clonagem ou expressão. Pode ser tipicamente usada uma estirpe de *E. coli*, tal como, por exemplo, a estirpe DH5 $\alpha$ , disponível a partir da American Type Culture Collection (ATCC), Rockville, MD, USA (Accession No. 31343), e a partir de fontes comerciais (Stratagene). Células hospedeiras eucariontes preferidas incluem células de levedura, embora possam também ser utilizadas de maneira eficaz células de mamíferos ou células de insectos.

O vector de expressão recombinante do invento é de preferência introduzido, por exemplo, transformado ou transfectado, para uma ou mais células hospedeiras de uma cultura de células substancialmente homogénea. O vector de expressão é geralmente introduzido em células hospedeiras de acordo com técnicas conhecidas, tais como, por exemplo,

por transformação do protoplasto, precipitação do fosfato de cálcio, tratamento com cloreto de cálcio, microinjecção, electroporação, transfecção por contacto com um vírus recombinado, transfecção mediada por liposoma, transfecção DEAE-dextran, transdução, conjugação, ou bombardeamento com micropjecteis. A selecção da transformação pode ser conduzida por meio de processos padrão, tais como por selecção para células expressando um marcador selec-cionável, por exemplo, resistência aos antibióticos, associada com o vector recombinante, tal como foi acima descrito.

Uma vez o vector de expressão introduzido na célula hospedeira, a integração e manutenção da sequência de codificação *aveC* quer no cromossoma da célula hospedeira que episomicamente podem ser confirmadas por meio de técnicas padrão, por exemplo, por análise de hibridização Southern, análise de enzima de restrição, análise PCR, incluindo transcriptase reversa PCR (rt-PCR), ou por ensaio imunológico para detectar o produto gene esperado. Células hospedeiras contendo e/ou expressando a sequência de codificação de *aveC* recombinante podem ser identificadas por qualquer uma de pelo menos quatro abordagens gerais que são bem conhecidas nesta técnica, incluindo: (i) DNA-DNA, DNA-RNA, ou RNA-hibridização RNA antisenso; (ii) detecção da presença de funções de gene "marcador"; (iii) rastreio do nível de transcrição tal como é medido pela expressão de *aveC*- transcritos mARN específicos na célula hospedeira; e (iv) detecção da presença de produto polipeptideo maduro

tal como seja medido, por exemplo, por imunoensaio ou pela presença de actividade biológica de AveC (por exemplo, a produção de proporções específicas e de quantidades de avermectinas indicativas de actividade de AveC em, por exemplo, células hospedeiras de *S. avermitilis*).

#### **Expressão E Caracterização De Um Produto Gene AveC Recombinante**

Uma vez que a sequência de codificação *aveC* nativa ou submetida a mutação tenha sido introduzida de um modo estável numa célula hospedeira apropriada, a célula hospedeira transformada é propagada mediante clonagem, e as células resultantes podem ser feitas crescer em condições que conduzam à produção máxima do produto gene AveC nativo ou submetido a mutação. Essas condições incluem de um modo típico células em crescimento para dar origem a uma densidade elevada. Quando a expressão do vector compreende um promotor induzível, condições de indução apropriadas tais como, por exemplo, deslocação da temperatura, esgotamento de nutrientes, adição de indutores gratuitos (por exemplo, análogos de hidratos de carbono, tais como isopropil- $\beta$ -D-tiogalactopiranósido (IPTG)), acumulação de subprodutos metabólicos em excesso, etc., são utilizados tal como seja necessário para induzir expressão.

Quando o produto gene AveC expresso é retido no interior das células hospedeiras, as células são colhidas e submetidas a lise, e o produto é isolado e purificado a partir do lisado em condições de extracção conhecidas nesta

técnica para minimizar degradação de proteína tal como, por exemplo, a 4° C, ou na presença de inibidores da protease, ou ambos. Quando o produto gene AveC expressado é segregado a partir das células hospedeiras, o meio nutriente esgotado pode ser simplesmente recolhido sendo o produto isolado a partir delas.

O produto gene AveC expresso pode ser isolado ou substancialmente purificado a partir de lisados de células ou de meio de cultura, como seja apropriado, usando métodos padrão, incluindo mas não se limitando a qualquer combinação dos métodos que se seguem: precipitação de sulfato de amónio, fraccionamento de tamanho, cromatografia de permuta iónica, HPLC, centrifugação de densidade, e cromatografia de afinidade. Quando o produto gene AveC expresso apresenta actividade biológica, o aumento da pureza da preparação pode ser monitorizado em cada passo do processo de purificação por utilização de um ensaio apropriado. Se o produto gene AveC expresso ou não apresentar actividade biológica, ele poderá ser detectado tendo como base, por exemplo, o tamanho, ou reactividade com um anticorpo de outro modo específicos para AveC, ou pela presença de uma etiqueta de fusão. Tal como é aqui usado, um produto gene AveC é "substancialmente purificado" quando o produto constitui mais do que cerca de 20% em peso da proteína numa preparação particular. Também, tal como é aqui usado, um produto gene AveC é "isolado" quando o produto constitui pelo menos cerca de 80% em peso da proteína numa preparação particular.

O presente invento proporciona assim um produto gene AveC de *S. avermitilis* expresso de um modo recombinante ou substancialmente purificado compreendendo a sequência de aminoácidos codificados por sequência codificando produto gene AveC de plasmídeo pSE186 (ATCC 209604), ou a sequência de aminoácido da FIGURA 1 (SEQ ID NO:2) ou uma sua porção substancial, e versões submetidas a mutação e suas variantes degeneradas.

O presente invento proporciona ainda um método para a produção de um produto gene AveC, compreendendo a cultura de uma célula hospedeira transformada com um vector de expressão recombinante, compreendendo o referido vector uma molécula de polinucleótido tendo um sequência de nucleótdos codificando o produto gene AveC, cuja molécula de polinucleótido se encontra em associação operativa com um ou mais elementos reguladores que controlam a expressão da molécula de polinucleótido na célula hospedeira, em condições que conduzem à produção do produto gene AveC recombinante, e recuperando o produto gene AveC a partir da cultura de células.

O produto gene AveC de *S. avermitilis* expresso de um modo recombinante é útil para uma série de finalidades, incluindo para rastrear compostos que alteram a função do produto gene AveC e desse modo modulam a biosintese da avermectina, e para criar antibióticos dirigidos contra o produto gene AveC.

Uma vez obtido um produto gene AveC com suficiente pureza, ele poderá ser caracterizado por métodos padrão, incluindo por SDS-PAGE, cromatografia de exclusão de tamanhos, análise de sequência de aminoácidos, actividade biológica na produção de produtos apropriados, na via biossintética da avermectina, etc. Por exemplo, a sequência de aminoácidos do produto gene AveC pode ser determinada usando técnicas de sequência pepetidicas padrão. O produto gene AveC pode ainda ser caracterizado usando análise sobre hidrofilicidade (ver, por exemplo, Hopp and Woods, 1981, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 78:3824), ou algoritmos de software análogos, para identificar regiões hidrofóbicos e hidrofílicas do produto gene AveC. A análise estrutural pode ser realizada para identificar regiões do produto gene AveC que assumem estruturas secundárias específicas. Métodos biofísicos tais como cristalografia por raios X (Engstrom, 1974, Biochem. Exp. Biol. 11: 7-13), modelação por computador (Fletterick e Zoller (eds), 1986, em: Current Communications in Molecular Biology, Cold Spring Laboratory, Cold Spring Harbor, NY), e ressonância magnética molecular (RMN) poderá ser usada para fazer um mapa e estudar sítios de interacção entre o produto gene AveC e seu substrato. Informação obtida a partir destes estudos poderá ser usada para seleccionar novos sítios para mutação no aveC ORF para ajudar a desenvolver novas estirpes de *S. avermitilis* tendo características de produção de avermectina mais desejáveis.

**Construção E Utilização De Mutantes De AveC**

Um objectivo principal do presente invento consiste em identificar novas mutações no alelo *aveC* de *S. avermetilis* que dão origem a uma alteração, e com maior preferência uma redução, na proporção de avermectinas B2:B1. O presente invento proporciona assim moléculas de polinucleótido úteis para produzir novas estirpes de células de *S. avermitilis* que apresentam uma modificação detectável na produção de avermectina em comparação com células da mesma estirpe mas que em vez disso expressam apenas o alelo de *aveC* do tipo selvagem. Numa forma de realização preferida, essas moléculas de polinucleótido são úteis para produzir novas estirpes de células de *S. avermitilis* que produzem avermectinas numa proporção reduzido de classe 2:1 em comparação com as células da mesma estirpe as quais pelo contrário expressam apenas o alelo *aveC* do tipo selvagem. As células dessas estirpes podem também compreender mutações adicionais para produzir uma quantidade aumentada de avermectinas em comparação com células da mesma estirpe que pelo contrário expressam apenas um único alelo *aveC* do tipo selvagem.

Mutações para o alelo *aveC* ou sequência de codificação incluem quaisquer mutações que introduzem uma ou mais substituições, deleções e/ou adições de aminoácido para o produto gene AveC, ou que dão origem a truncamento do produto gene AveC, ou qualquer sua combinação, e que produz o resultado desejado. Essas sequências de alelo *aveC*

submetidas a mutação pretendem incluir quaisquer suas variantes degeneradas. Por exemplo, o presente invento proporciona uma molécula de polinucleótido compreendendo a sequência de nucleótidos do alelo *aveC* ou uma sua variante degenerada, ou a sequência que codifica produto gene AveC de plasmídeo pSE186 (ATCC 209604) ou uma sua variante degenerada, ou a sequência de nucleótidos do ORF *aveC* de *S. avermitilis* tal como é apresentado na FIGURA 1 (SEQ ID NO:1) ou uma sua variante degenerada, mas que ainda compreende mutações que codificam uma combinação de substituições de aminoácido em posições seleccionadas no produto gene AveC. Numa forma de realização não limitativa, essas substituições ocorrem numa ou mais posições de aminoácido do produto gene AveC correspondendo a posições de aminoácido 25, 28, 35, 36, 38, 40, 41, 48, 55, 61, 78, 84, 89, 90, 99, 107, 108, 111, 120, 123, 136, 138, 141, 154, 159, 163, 179, 192, 196, 198, 200, 202, 220, 228, 229, 230, 231, 234, 238, 239, 250, 252, 266, 275, 278, 289 ou 298 de SEQ ID NO:2. Combinações preferidas de posições de aminoácido a ser substituída compreendem um ou mais resíduos de aminoácido D48, A61, A89, L136, S138, A139, R163, G179, V196, A198, E238 e P289. De um modo específico combinações preferidas de substituições de aminoácido compreendem substituições tanto em D48 como em G179, e mais especificamente D48E e G179S. Exemplos específicos de combinações de substituições de aminoácido que dão origem a uma redução em proporções ciclo-hexil B2:ciclo-hexil B1 são indicados na FIGURA 6A-J.

O presente invento proporciona assim uma molécula de polinucleótido compreendendo uma sequência de nucleótidos a qual de outro modo é igual ao alelo *aveC* de *Streptomyces avermitilis*, à sequência que codifica produto gene *AveC* de *S. avermitilis* de plasmídeo pSE186 (ATCC 209604) da sequência de nucleótidos do ORF *aveC* de *S. avermetilis* tal como é apresentado na FIGURA 1 (SEQ ID NO:1), ou uma sua variante degenerada, mas cuja sequência de nucleótidos compreende mutações que codificam uma combinação de substituições de aminoácido em resíduos de aminoácido correspondendo às posições de aminoácido de SEQ ID NO:2, de modo a que células de *S. avermetilis* da estirpe ATCC 53692 em que o alelo *aveC* do tipo selvagem tenha sido inactivado e que expressam a molécula de polinucleótido compreendendo a sequência de nucleótidos submetida a mutação são capazes de produzir uma proporção da classe 2:1 de avermectinas que é reduzido em comparação com a proporção produzido por células de *S. avermitilis* da estirpe ATCC 53692 que pelo contrário expressa apenas o alelo *aveC* do tipo selvagem, em que quando as avermectinas da classe 2:1 são avermectinas ciclo-hexil B2:ciclo-hexil B1, a proporção de avermectinas da classe 2:1 é de 0,35:1. Numa forma de realização mais preferida, a proporção de avermectinas ciclo-hexil B2:ciclo-hexil B1 é de cerca de 0,30:1 ou inferior. Numa forma de realização mais preferida, a proporção de avermectinas ciclo-hexil B2:ciclo-hexil B1 é de cerca de 0,25: ou inferior. Numa forma de realização mais preferida, a proporção de avermectinas ciclo-hexil B2:ciclo-hexil B1 é de cerca de 0,20:1 ou inferior.

Numa sua forma de realização particular, a combinação de substituições de aminoácido compreende a combinação de grupo (a): D48E, A61T, A89T, S138T, A139T, G179S, A198G, P289L. Um exemplo não limitativo de um plasmídeo codificando estas substituições de aminoácido é pSE538 (ver FIGURA 6).

Numa outra sua forma de realização particular, a combinação de substituições de aminoácido compreende a combinação de grupo (b): G40S, D48E, L136P, G179S, E238D. Um exemplo não limitativo de um plasmídeo codificando estas substituições de aminoácido é pSE559.

Numa outra sua forma de realização particular, a combinação de substituições de aminoácido compreende a combinação de grupo ©: D48E, L136P, R163Q, G179S. Um exemplo não limitativo de um plasmídeo codificando estas substituições de aminoácido é pSE567.

Numa outra sua forma de realização particular, a combinação de substituições de aminoácido compreende a combinação de grupo (d): D48E, L136Q, G179Q, E238D. Exemplos não limitativos de plasmídeos codificando estas substituições de aminoácido são pSE570 e pSE572.

Numa outra sua forma de realização particular, a combinação de substituições de aminoácido compreende a combinação de grupo (e): D48E, L136P, R163Q, G179S, A200G,

E238D. Um exemplo não limitativo de um plasmídeo codificando estas substituições de aminoácido é pSE571.

Numa sua forma de realização particular, a combinação de substituições de aminoácido compreende a combinação de grupo (f): D48E, L136P, G179S, E238D. Exemplos não limitativos de plasmídeos codificando essas substituições de aminoácido são pSE501 e pSE546.

Numa outra sua forma de realização particular, a combinação de substituições de aminoácido compreende a combinação de grupo (g): D48E, A61T, L136P, G179S, E238D. Um exemplo não limitativo de um plasmídeo codificando estas substituições de aminoácido é pSE510.

Numa outra sua forma de realização particular, a combinação de substituições de aminoácido compreende a combinação de grupo (h): D48E, A61T, L136P, G179S. Um exemplo não limitativo de um plasmídeo codificando estas substituições de aminoácido é pSE512.

Numa outra sua forma de realização particular, a combinação de substituições de aminoácido compreende a combinação de grupo (I): D48E, A89T, S138T, A139T, G179S. Um exemplo não limitativo de um plasmídeo codificando estas substituições de aminoácido é pSE519.

Numa outra sua forma de realização particular, a combinação de substituições de aminoácido compreende a

combinação de grupo (j): D48E, A61T, L136P, G179S, A198G, P202S, E238D, P289L. Um exemplo não limitativo de um plasmídeo codificando estas substituições de aminoácido é pSE526.

Numa outra sua forma de realização particular, a combinação de substituições de aminoácido compreende a combinação de grupo (k): D48E, A61T, L136P, S138T, A139F, G179S, E238D, P289L. Um exemplo não limitativo de um plasmídeo codificando estas substituições de aminoácido é pSE528.

Numa outra sua forma de realização particular, a combinação de substituições de aminoácido compreende a combinação de grupo (l): D48E, L136P, G179S, A198G, E238D, P289L. Um exemplo não limitativo de um plasmídeo codificando estas substituições de aminoácido é pSE530.

Numa outra sua forma de realização particular, a combinação de substituições de aminoácido compreende a combinação de grupo (m): D48E, A61T, S138T, A139F, G179S, A198G, P289L. Um exemplo não limitativo de um plasmídeo codificando estas substituições de aminoácido é pSE531.

Numa outra sua forma de realização particular, a combinação de substituições de aminoácido compreende a combinação de grupo (n): D48E, L84P, G111V, S138T, A139T, G179S, A198G, P289L. Um exemplo não limitativo de um plasmídeo codificando estas substituições de aminoácido é pSE534.

Numa outra sua forma de realização particular, a combinação de substituições de aminoácido compreende a combinação de grupo (o): Y28C, D48E, A61T, A89T, S138T, A139T, G179S, E238D. Um exemplo não limitativo de um plasmídeo codificando estas substituições de aminoácido é pSE535.

Numa outra sua forma de realização particular, a combinação de substituições de aminoácido compreende a combinação de grupo (p): D48E, A61T, A107T, S108G, L136P, G179S, S192A, E238D, P289L. Um exemplo não limitativo de um plasmídeo codificando estas substituições de aminoácido é pSE542.

Numa outra sua forma de realização particular, a combinação de substituições de aminoácido compreende a combinação de grupo (q): D48E, L136P, R250W. Um exemplo não limitativo de um plasmídeo codificando estas substituições de aminoácido é pSE545.

Numa outra sua forma de realização particular, a combinação de substituições de aminoácido compreende a combinação de grupo (r): D48E, A89T, S138T, A139T, R163Q, G179S. Um exemplo não limitativo de um plasmídeo codificando estas substituições de aminoácido é pSE548.

Numa outra sua forma de realização particular, a combinação de substituições de aminoácido compreende a

combinação de grupo (s): D48E, L136P, G179S, A198G, P289L. Um exemplo não limitativo de um plasmídeo codificando estas substituições de aminoácido é pSE552.

Numa outra sua forma de realização particular, a combinação de substituições de aminoácido compreende a combinação de grupo (t): D48E, F78L, A89T, L136P, G179S. Um exemplo não limitativo de um plasmídeo codificando estas substituições de aminoácido é pSE557.

Numa outra sua forma de realização particular, a combinação de substituições de aminoácido compreende a combinação de grupo (u): D48E, A89T, S138T, A139T, G179S, E238D, F278L. Exemplos não limitativos de plasmídeos codificando estas substituições de aminoácido são pSE564 e pSE565.

Numa outra sua forma de realização particular, a combinação de substituições de aminoácido compreende a combinação de grupo (v): D48E, A89T, L136P, R163Q, G179S. Um exemplo não limitativo de um plasmídeo codificando estas substituições de aminoácido é pSE568.

Numa outra sua forma de realização particular, a combinação de substituições de aminoácido compreende a combinação de grupo (w): D48E, A61T, A89T, G111V, S138T, A139F, G179F, E238D, P289L. Um exemplo não limitativo de um plasmídeo codificando estas substituições de aminoácido é pSE543.

Numa outra sua forma de realização particular, a combinação de substituições de aminoácido compreende a combinação de grupo (x): D25G, D48E, A89T, L136P, S138T, A139T, V141A, I159T, R163Q, G179S. Um exemplo não limitativo de um plasmídeo codificando estas substituições de aminoácido é pSE504.

Numa outra sua forma de realização particular, a combinação de substituições de aminoácido compreende a combinação de grupo (y): D48E, A89T, S90G, L136P, R1163Q, G179S, E238D. Um exemplo não limitativo de um plasmídeo codificando estas substituições de aminoácido é pSE508.

Numa outra sua forma de realização particular, a combinação de substituições de aminoácido compreende a combinação de grupo (z): D48E, A61T, A89T, G111V, S138T, A139T, G179S, E238D, P289L. Um exemplo não limitativo de um plasmídeo codificando estas substituições de aminoácido é pSE511.

Numa outra sua forma de realização particular, a combinação de substituições de aminoácido compreende a combinação de grupo (aa): D48E, A89T, S138T, A139T, G179S. Um exemplo não limitativo de um plasmídeo codificando estas substituições de aminoácido é pSE520.

Numa outra sua forma de realização particular, a combinação de substituições de aminoácido compreende a

combinação de grupo (ab): D48E, L136P, R163Q, G179S, S231L. Um exemplo não limitativo de um plasmídeo codificando estas substituições de aminoácido é pSE523.

Numa outra sua forma de realização particular, a combinação de substituições de aminoácido compreende a combinação de grupo (ac): D48E, L136P, S138T, A139F, G179S, V196A, E238D. Um exemplo não limitativo de um plasmídeo codificando estas substituições de aminoácido é pSE527.

Numa outra sua forma de realização particular, a combinação de substituições de aminoácido compreende a combinação de grupo (ad): D48E, A61T, A89T, F99S, S138T, A139T, G179S, E238D. Um exemplo não limitativo de um plasmídeo codificando estas substituições de aminoácido é pSE539.

Numa outra sua forma de realização particular, a combinação de substituições de aminoácido compreende a combinação de grupo (ae): G35S, D48E, A89T, S138T, A139T, G179S, P289L. Um exemplo não limitativo de um plasmídeo codificando estas substituições de aminoácido é pSE540.

Numa outra sua forma de realização particular, a combinação de substituições de aminoácido compreende a combinação de grupo (af): D48E, A61T, A89T, S138T, A139T, G179S, V196A, E238D. Um exemplo não limitativo de um plasmídeo codificando estas substituições de aminoácido é pSE547.

Numa outra sua forma de realização particular, a combinação de substituições de aminoácido compreende a combinação de grupo (ag): D48E, A89T, G111V, S138T, A139T, G179S, A198G, E238D. Um exemplo não limitativo de um plasmídeo codificando estas substituições de aminoácido é pSE550.

Numa outra sua forma de realização particular, a combinação de substituições de aminoácido compreende a combinação de grupo (ah): S41G, D48E, A89T, L136P, G179S. Um exemplo não limitativo de um plasmídeo codificando estas substituições de aminoácido é pSE558.

Numa outra sua forma de realização particular, a combinação de substituições de aminoácido compreende a combinação de grupo (ai): D48E, A89T, L136P, R163Q, G179S, P252S. Um exemplo não limitativo de um plasmídeo codificando estas substituições de aminoácido é pSE563.

Numa outra sua forma de realização particular, a combinação de substituições de aminoácido compreende a combinação de grupo (aj): D48E, A89T, L136P, G179S, F234S. Um exemplo não limitativo de um plasmídeo codificando estas substituições de aminoácido é pSE566.

Numa outra sua forma de realização particular, a combinação de substituições de aminoácido compreende a combinação de grupo (ak): D48E, A89T, L136P, R163Q, G179S,

E238D. Exemplos não limitativos de plasmídeos codificando estas substituições de aminoácido são pSE573 e pSE578.

Numa outra sua forma de realização particular, a combinação de substituições de aminoácido compreende a combinação de grupo (al): Q36R, D48E, A89T, L136P, G179S, E238D. Um exemplo não limitativo de um plasmídeo codificando estas substituições de aminoácido é pSE574.

Numa outra sua forma de realização particular, a combinação de substituições de aminoácido compreende a combinação de grupo (am): D48E, A89T, L136P, R163P, R163Q, G179S. Exemplos não limitativos de plasmídeos codificando estas substituições de aminoácido são pSE575 e pSE576.

Numa outra sua forma de realização particular, a combinação de substituições de aminoácido compreende a combinação de grupo (an): D48E, A89T, S138T, G179S. Um exemplo não limitativo de um plasmídeo codificando estas substituições de aminoácido é pSE577.

Numa outra sua forma de realização particular, a combinação de substituições de aminoácido compreende a combinação de grupo (ao): D48E, A89T, L136P, G179S, E238D. Exemplos não limitativos de plasmídeos codificando estas substituições de aminoácido são pSE502 e pSE524.

Numa outra sua forma de realização particular, a combinação de substituições de aminoácido compreende a

combinação de grupo (ap): D48E, A89T, L136P, K154E, G179S, E238D. Um exemplo não limitativo de um plasmídeo codificando estas substituições de aminoácido é pSE503.

Numa outra sua forma de realização particular, a combinação de substituições de aminoácido compreende a combinação de grupo (aq): D48E, A89T, S138T, A139T, K154R, G179S, V196A, P289L. Um exemplo não limitativo de um plasmídeo codificando estas substituições de aminoácido é pSE505.

Numa outra sua forma de realização particular, a combinação de substituições de aminoácido compreende a combinação de grupo (ar): D48E, A89T, S138T, A139T, G179S, V196A, E238D. Um exemplo não limitativo de um plasmídeo codificando estas substituições de aminoácido é pSE506.

Numa outra sua forma de realização particular, a combinação de substituições de aminoácido compreende a combinação de grupo (as): D48E, A61T, A89T, L136P, G179S, V196A, A198G, P289L. Um exemplo não limitativo de um plasmídeo codificando estas substituições de aminoácido é pSE507.

Numa outra sua forma de realização particular, a combinação de substituições de aminoácido compreende a combinação de grupo (at): D48E, A61T, S138T, A139F, G179S, G196A, E238D, P289L. Um exemplo não limitativo de um plasmídeo codificando estas substituições de aminoácido é pSE509.

Numa outra sua forma de realização particular, a combinação de substituições de aminoácido compreende a combinação de grupo (au): D48E, A89T, L136P, G179S. Exemplos não limitativos de plasmídeos codificando estas substituições de aminoácido são pSE514 e pSE525.

Numa outra sua forma de realização particular, a combinação de substituições de aminoácido compreende a combinação de grupo (av): D48E, A89T, V120A, L136P, G179S. Um exemplo não limitativo de um plasmídeo codificando estas substituições de aminoácido é pSE515.

Numa outra sua forma de realização particular, a combinação de substituições de aminoácido compreende a combinação de grupo (aw): D48E, A61T, A89T, S138T, A139F, G179S, V196A, A198G, E238D. Um exemplo não limitativo de um plasmídeo codificando estas substituições de aminoácido é pSE517.

Numa outra sua forma de realização particular, a combinação de substituições de aminoácido compreende a combinação de grupo (ax): D48E, A61T, A89T, G111V, S138T, A139F, G179S, V196A, E238D. Um exemplo não limitativo de um plasmídeo codificando estas substituições de aminoácido é pSE518.

Numa outra sua forma de realização particular, a combinação de substituições de aminoácido compreende a

combinação de grupo (ay): D48E, A61T, A89T, S138T, A139T, G179S, V196A, E238D, P289L. Exemplos não limitativos de plasmídeos codificando estas substituições de aminoácido são pSE529 e pSE554.

Numa outra sua forma de realização particular, a combinação de substituições de aminoácido compreende a combinação de grupo (az): D48E, A61T, A89T, L136P, S138T, A139F, G179S, A198G, E238D. Um exemplo não limitativo de um plasmídeo codificando estas substituições de aminoácido é pSE532

Numa outra sua forma de realização particular, a combinação de substituições de aminoácido compreende a combinação de grupo (ba): A89T, S138T, Q139F, G178S, A198G, V220A. Um exemplo não limitativo de um plasmídeo codificando estas substituições de aminoácido é pSE536.

Numa outra sua forma de realização particular, a combinação de substituições de aminoácido compreende a combinação de grupo (bb): D48E, A61T, A89T, S138T, A139T, G179S, V196A, E238D, R239H, P289L.. Um exemplo não limitativo de um plasmídeo codificando estas substituições de aminoácido é pSE537.

Numa outra sua forma de realização particular, a combinação de substituições de aminoácido compreende a combinação de grupo (bc): D48E, A61T, A89T, L136P, G179S, P289L. Um exemplo não limitativo de um plasmídeo codificando estas substituições de aminoácido é pSE541.

Numa outra sua forma de realização particular, a combinação de substituições de aminoácido compreende a combinação de grupo (bd): D48E, A89T, S138T, A139T, G179S, V196A, E238D, P289L. Exemplos não limitativos de plasmídeos codificando estas substituições de aminoácido são pSE549 e pSE533.

Numa outra sua forma de realização particular, a combinação de substituições de aminoácido compreende a combinação de grupo (be): D48E, A61T, A89T, S138T, A139F, G179S, V196A, E238D. Um exemplo não limitativo de um plasmídeo codificando estas substituições de aminoácido é pSE551.

O presente invento proporciona ainda uma molécula de polinucleótido compreendendo uma sequência de nucleótidos que é de outro modo a mesma que o alelo *aveC* de *Streptomyces avermitilis*, a sequência que codifica produto gene AveC de *S-avermitilis* de plasmídeo pSE 186 (ATCC 209604) ou a sequência de nucleótidos do ORF *aveC* de *S. avermitilis* tal como é apresentado na FIGURA 1 (SEQ ID NO:1), ou uma sua variante degenerada, mas cuja sequência de nucleótidos compreende ainda mutações codificando uma combinação de substituições de aminoácido em resíduos de aminoácido correspondendo às posições de aminoácido de SEQ ID NO:2, de modo a que células da estirpe de *S. avermitilis* da estirpe ATCC 53692 em que o alelo *aveC* do tipo selvagem foi inactivado e que expressa uma molécula de polinu-

cleótido compreendendo a sequência de nucleótidos submetidos a mutação são capazes de produzir uma avermectinas da classe 2:1 que é reduzido em comparação com a proporção produzido por células de *S. avermitilis* da estirpe ATCC 53692 que pelo contrário expressam apenas o alelo *aveC* do tipo selvagem, em que quando as avermectinas 2:1 são avermectinas ciclo-hexil B2:ciclo-hexil B1, a proporção das avermectinas da classe 2:1 é reduzido até cerca de 0,40 ou inferior, e em que a combinação de substituições de aminoácido compreende uma combinação seleccionada de entre o grupo consistindo em:

- (bf) D48E, S138T, A139T, G179S, E238S; e
- (bg) Y28C, Q38R, D48E, L136P, G179S, E238D.

Exemplos não limitativos de um plasmídeo codificando as substituições de aminoácido de grupo (bf) são pSE556 e pSE569. Um exemplo não limitativo de um plasmídeo codificando as substituições de aminoácido de grupo (bg) é pSE561.

O presente invento contempla que qualquer uma das substituições de aminoácidos acima mencionadas poderá ser realizada por meio de qualquer modificação à sequência de nucleótidos do alelo *aveC* ou uma sua variante degenerada que dá origem a essas substituições. Por exemplo, é possível efectuar a maior parte das substituições de aminoácido aqui descritas modificando uma sequência nativa de codões ou uma sua variante degenerada para qualquer um

dos vários codões alternativos que codificam a mesma substituição de aminoácido. As várias sequências possíveis que podem codificar as substituições de aminoácido acima mencionadas poderão tornar-se rapidamente aparentes para qualquer especialista nesta técnica tendo em vista a forma de realização do presente invento e a degenerescência conhecida do código genético. Numa forma de realização não limitativa para cada combinação particular acima referida, as substituições de aminoácido são conseguidas por modificações de nucleótido não silenciosas indicadas na FIGURA 6.

Tal como é aqui usada, a frase "a combinação de substituições de aminoácido compreende a combinação de grupo ...", etc., significa que as substituições de aminoácido no produto gene AveC de acordo com o presente invento incluem pelo menos as substituições que são especificamente referidas, e pode incluir outras substituições de aminoácido, ou deleções de aminoácido, ou adições de aminoácido, ou algumas suas combinações, em que a expressão do resultante produto gene AveC resultante na célula de *S. avermitilis* proporciona uma redução desejável na proporção de avermectinas B2:B1.

Mutações para o alelo *aveC* ou sua variante degenerada poderão ser realizadas por qualquer uma de uma série de métodos conhecidos, incluindo por utilização de PCR sujeito a erro, ou por mutagenese de cassete. Por exemplo, mutagenese dirigida a oligonucleótido poderá ser

utilizada para alterar a sequência do alelo *aveC* ou ORF num modo definido tal como, por exemplo, para introduzir um ou mais sítios de restrição, ou um codão de terminação, para regiões específicas no alelo *aveC* ou ORF. Métodos tais como os descritos na Patente dos E.U.A. No. 5.605.793, Patente dos E.U.A. No. 5.830.721 e Patente dos E.U.A. No. 5.837.458, que envolvem fragmentação aleatória, ciclos repetidos de mutagenese, e rearranjo de nucleótido, podem também ser usados para dar origem a grandes bibliotecas de polinucleótidos tendo sequências de nucleótidos codificando mutações de *aveC*.

Mutações alvo podem ser úteis, particularmente quando servem para alterar um ou mais resíduos de aminoácido conservados no produto gene AveC. Por exemplo, uma comparação da sequência de aminoácido deduzida do produto gene AveC de *S. avermitilis* (SEQ ID NO:2) com produtos gene homólogo AveC a partir de *S. griseochromogenes* (SEQ ID NO:5) e *S. hygroscopicus* (SEQ ID NO:4), tal como é descrito na Patente dos E.U.A. No. 6.248.579, indica sítios de conservação sognificativa de resíduos de aminoácido entre estas espécies. Mutagenese submetida a alvo que leva a uma modificação num ou mais destes resíduos de aminoácido conservados pode ser eficaz na produção de novas estirpes mutantes que apresentam alterações desejáveis em produção de avermectina.

Mutagenese aleatória pode também ser útil, e pode ser realizada expondo células de *S. avermitilis* a radiação

ultravioleta ou a raios X, ou a agentes químicos mutagénicos tais como N-metil-N'-nitrosoguanidina, metanossulfonato de etilo, ácido nitroso ou mostardas de azoto. Ver, por exemplo, Ausubel, 1989, acima referido, para revisão de técnicas de mutagenese.

Uma vez geradas moléculas de polinucleótido submetidas a mutação, elas são rastreadas para determinar se podem modular biossíntese de avermectina em *S. avermitilis*. Numa forma de realização preferida, uma molécula de polinucleótido tendo uma sequência de nucleótido submetida a mutação é testada por complementação de uma estirpe de *S. avermitilis* em que o gene *aveC* tenha sido inactivado para dar origem a um fundo *aveC* negativo (*aveC'*). Num método não limitativo, a molécula de polinucleótido submetida a mutação é ligada a um plasmídeo de expressão em associação operativa com um ou mais elementos regulatórios, cujo plasmídeo também comprehende de preferência um ou mais genes de resistência à droga para permitir uma selecção de células transformadas. Este vector é então transformado em células hospedeiras *aveC'* usando técnicas conhecidas, e células transformadas são seleccionadas e cultivadas em meios de fermentação apropriados em condições que permitam ou induzam produção de avermectina, por exemplo, incluindo subunidades de partida no meio, e cultivando em condições óptimas para produção de avermectina tal como é conhecido nesta técnica. Produtos de fermentação são então analisados por HPLC (cromatografia líquida de elevada performance) a fim de

determinar a capacidade da molécula de polinucleótido submetida a mutação para complementar a célula hospedeira. Vários vectores de plasmídeo tendo moléculas de polinucleótido submetidas a mutação capazes de reduzir a proporção B2:B1 de avermectinas, incluindo pSE188, pSE199, pSE231, pSE239, e pSE290 a pSE297 são exemplificados na Secção 8.3, mais abaixo. Outros exemplos desses vectores de plasmídeo são apresentados na FIGURA 6.

Qualquer um dos métodos acima mencionados do presente invento poderá ser realizado usando meios de cultura de fermentação de preferência suplementados com ácido ciclo-hexano carboxílico, embora outros precursores de ácido gordo apropriados, tais como qualquer um dos precursores de ácido gordo indicados no Quadro 1, ou ácido metiltioláctico, possam também ser usados.

Uma vez que tenha sido identificada uma molécula de polinucleótido submetida a mutação que module a produção de avermectina numa direcção desejável, a localização da mutação na sequência de nucleótidos poderá ser determinada. Por exemplo, uma molécula de polinucleótido tendo uma sequência de nucleótidos codificando um produto gene AveC submetido a mutação poderá ser isolada por PCR e submetida a análise de sequência de DNA usando métodos conhecidos. Comparando a sequência de DNA do alelo *aveC* submetido a mutação com a do alelo *aveC* do tipo selvagem, a(s) mutação (mutações) responsável(responsáveis) pela alteração na produção de avermectina poderá (poderão) ser determinada.

nada(s). Por exemplo, produtos gene AveC de *S. avermitilis* compreendendo quer substituições de aminoácido simples em qualquer um dos resíduos 55 (S55F), 138 (S138T), 139 (A139T), ou 230 (G230D), quer substituições duplas nas posições 138 (S138T) e 139 (A139T ou A139F), proporcionaram modificações na função do produto gene AveC tais que a proporção da classe 2:1 de avermectinas produzidas foi alterada (ver Secção 8, mais abaixo), em que as posições de aminoácido correspondem às apresentadas na FIGURA 1 (SEQ ID NO:2). Além disso, as seguintes sete combinações de mutações cada uma delas revelou que reduzia de um modo eficaz a proporção 2:1 de avermectinas. (1) D48E/A89T; (2) S138T/A139T/G179S; (3) Q38P/L136P/E238D; (4) F99S/S138T/A139T/G179S; (5) A139T/M228T; (6) G111V/P289L; (7) A139T/K154E/Q298H. O presente invento proporciona cinquenta e nove (59) combinações adicionais de mutações que demonstram reduzir a proporção ciclo-hexil B2:ciclo-hexil B1 de avermectinas e estas são apresentadas na FIGURA 6 e indicadas nas reivindicações apensas.

Tal como são aqui usadas, as designações acima mencionadas, tais como A139T, indicam o resíduo original de aminoácido por simples designação de letra, a qual neste exemplo é alanina (A) na posição indicada, que neste exemplo se situa na posição 139 (referindo-se a SEQ ID NO:2) do polipeptideo, seguindo-se o resíduo de aminoácido que substitui o resíduo de aminoácido original, o qual neste exemplo é treonina (T).

Tal como é aqui usado, quando um resíduo de aminoácido codificado por um alelo *aveC* no cromossoma de *S. avermitilis*, ou num vector ou molécula isolada de polinucleótido do presente invento é referido como "correspondendo a" um resíduo particular de aminoácido de SEQ ID NO:2, ou quando uma substituição de aminoácido é referida como ocorrendo numa posição particular "correspondendoa" à de um resíduo de aminoácido numerado específico de SEQ ID NO:2, isto pretende referir-se ao resíduo de aminoácido na mesma localização relativa no produto gene *AveC*, o qual o técnico especialista poderá rapidamente determinar tendo como referência a sequência de aminoácidos aqui apresentada como SEQ ID NO:2.

Tal como é aqui usado, quando mutações específicas no alelo *aveC* codificando mutações particulares são indicadas como modificações de base em posições específicas de nucleótido no alelo *aveC* "correspondendo a" posições particulares de nucleótido tal como é indicado em SEQ ID NO.1, ou quando uma posição de nucleótido no alelo *aveC* é de outro modo referido como "correspondendo a" uma posição particular de nucleótido na SEQ ID NO:1, isto pretende referir-se ao nucleótido na mesma localização relativa na sequência de nucleótidos *aveC* ou uma sua variante degenerada, que o técnico especializado poderá determinar rapidamente tendo como referência a sequência de nucleótidos aqui apresentada como SEQ ID NO:1.

Tal como é aqui usado para se referir a

proporções de avermectinas ciclo-hexil B2:ciclo-hexil B1, o termo "cerca de" refere-se ao valor numérico especificamente referido mais ou menos 10% desse valor indicado.

Uma molécula de polinucleótido do presente invento pode ser "isolado", o que significa que é ou (i) purificado até ao grau que se encontre substancialmente livre de outras moléculas de polinucleótido tendo diferentes sequências de nucleótidos, ou (ii) presente no meio ambiente em que ele não ocorreria naturalmente, por exemplo, onde um alelo *aveC* de *S. avermitilis*, ou uma sua versão submetida a mutação, está presente numa célula diferente de uma célula de *S. avermitilis*, ou (iii) presente sob a forma em que não correria naturalmente, por exemplo, como uma peça mais curta de DNA, tal como um fragmento de restrição digerido a partir de um cromossoma bacteriano, compreendendo de um modo predominante a região de codificação *aveC* ou uma sua versão submetida a mutação, com ou sem quaisquer suas sequências reguladoras associadas, ou como integradas subsequentemente numa peça heteróloga de DNA, tal como o cromossoma de uma célula bacteriana (diferente de uma célula de *S. avermitilis*) ou o DNA de um vector tal como um plasmídeo ou agente fágico, ou integrado num cromossoma de *S. avermitilis* num local diferente do local do alelo *aveC* nativo.

O presente invento proporciona ainda um vector recombinante compreendendo uma molécula de polinucleótido do presente invento. Um tal vector recombinante poderá ser

usado para atingir qualquer uma das moléculas de polinucleótido compreendendo sequências de nucleótidos submetidas a mutação do presente invento para o sítio do alelo *aveC* do cromossoma de *S. avermitilis* para inserir ou substituir o ORF *aveC* de uma sua porção, por exemplo, por recombinação homóloga. De acordo com o presente invento, contudo, uma molécula de polinucleótido compreendendo uma sequência de nucleótidos submetida a mutação do presente invento aqui proporcionada poderá também funcionar de modo a modular a biossíntese de avermectina quando inserida no cromossoma de *S. avermitilis* num sítio diferente do sítio do alelo *aveC*, ou quando mantida episomicamente nas células de *S. avermitilis*. Assim o presente invento proporciona ainda vectores compreendendo uma molécula de polinucleótido compreendendo uma sequência de nucleótidos submetida a mutação do presente invento, cujos vectores podem ser usados para inserir a molécula de polinucleótido num sítio no cromossoma de *S. avermitilis* diferente de um sítio no gene *aveC*, ou para ser mantido episomicamente.

Numa forma de realização não limitativa, o vector é um vector de substituição de gene que pode ser usado para inserir um alelo *aveC* submetido a mutação ou uma sua variante degenerada de acordo com o presente invento para células de uma estirpe de *S. avermitilis*, dando desse modo origem a novas estirpes de *S. avermitilis*, cujas células podem produzir avermectinas numa proporção reduzido de classe 2:1 em comparação com células da mesma estirpe que pelo contrário expressam apenas o alelo *aveC* de tipo

selvagem. Esses vectores de substituição de gene podem ser construídos usando moléculas de polinucleótido submetidas a mutação presentes em vectores de expressão aqui proporcionados, tais como os vectores de expressão exemplificados na Secção 8 mais abaixo.

O presente invento proporciona ainda vectores que podem ser usados para inserir um alelo *aveC* submetido a mutação ou uma sua variante degenerada para células de uma estirpe de *S. avermitilis* para dar origem a novas estirpes de células que produzem quantidades alteradas de avermectinas em comparação com células da mesma estirpe que pelo contrário expressam apenas o alelo *aveC* de tipo selvagem. Numa forma de realização preferida, a quantidade de avermectinas produzidas pelas células é aumentada. Numa forma de realização específica embora não limitativa, um tal vector compreende um promotor forte tal como é conhecido nesta técnica, tal como, por exemplo, o promotor *ermE* constitutivo forte a partir de *Saccharopolyspora erythraea*, que está situada a montante de, e em associação operativa com o ORF *aveC*. Esses vectores podem ser construídos usando o alelo *aveC* submetido a mutação de plasmídeo pSE189, e de acordo com métodos descritos na Patente dos E.U.A. No. 6.248.579.

O presente invento proporciona vectores de substituição de gene que são úteis para inactivar o gene *aveC* numa estirpe de tipo selvagem de *S. avermitilis*. Numa forma de realização não limitativa, esses vectores de

substituição de gene podem ser construídos usando a molécula de polinucleótido submetido a mutação presente no plasmídeo pSE180 (ATCC 209605), que é exemplificado na Secção 8.1, mais abaixo (FIGURA 3). O presente invento proporciona ainda vectores de substituição de gene que compreendem uma molécula de polinucleótido ou consistindo em sequências de nucleótido que naturalmente flanqueiam o gene *aveC* *in situ* no cromossoma de *S. avermitilis*, incluindo, por exemplo, as sequências de nucleótidos que flanqueiam apresentadas na FIGURA 1 (SEQ ID NO:1), cujos vectores podem ser usados para deletar o *S. avermitilis* com ORF.

O presente invento proporciona ainda uma célula hospedeira compreendendo uma molécula de polinucleótido ou vector recombinante do presente invento. A célula hospedeira pode ser qualquer célula procariante ou eucariante capaz de ser usada como um hospedeiro para a molécula de polinucleótido ou vector recombinante. Numa forma de realização preferida, a célula hospedeira é uma célula bacteriana. Numa forma de realização mais preferida, a célula hospedeira é uma célula de *Streptomyces*. Numa forma de realização mais preferida, a célula hospedeira é uma célula de *Streptomyces avermitilis*.

O presente invento proporciona ainda um método para produzir uma nova estirpe de *Streptomyces avermitilis*, compreendendo (i) mutação do alelo *aveC* numa célula de uma estirpe de *S. avermitilis*, cuja mutação dá origem a uma

combinação de substituições de aminoácido no produto gene AveC, ou (ii) introduzindo para uma célula de uma estirpe de *S. avermitilis* um alelo *aveC* submetido a mutação com alelo *aveC* ou uma sua variante degenerada codificando um produto gene AveC compreendendo uma combinação de substituições de aminoácido, em que a combinação de substituições de aminoácido é seleccionada de entre (a) a (be) acima indicados.

O presente invento proporciona ainda um método para produzir uma nova estirpe de *S. avermitilis*, compreendendo (i) mutação do alelo *aveC* numa célula de uma estirpe de *S. avermitilis*, mutação essa que dá origem a uma combinação de substituições de aminoácido no produto gene AveC, ou (ii) introdução para uma célula de uma estirpe de *S. avermitilis* de um alelo *aveC* submetido a mutação ou uma sua variante degenerada codificando um produto gene AveC compreendendo uma combinação de substituições de aminoácido, em que células compreendendo o alelo *aveC* submetido a mutação ou uma sua variante degenerada são capazes de produzir avermectinas ciclo-hexil B2:ciclo-hexil B1 numa proporção de 0,35:1 ou inferior. Numa sua forma de realização não limitativa, o alelo *aveC* submetido a mutação ou uma sua variante degenerada codifica um produto gene AveC compreendendo uma combinação de substituições de aminoácido seleccionada de entre o grupo consistindo em de (a) a (be) acima indicados.

Numa sua forma de realização preferida, a

proporção de avermectinas ciclo-hexil B2:ciclo-hexil B1 é de cerca de 0,30:1 ou inferior. Numa sua forma de realização não limitativa, o alelo *aveC* submetido a mutação ou uma sua variante degenerada codifica um produto gene compreendendo uma combinação de substituições de aminoácido seleccionada de entre o grupo consistindo em de (f) a (be) acima indicados.

Numa sua forma de realização preferida, a proporção de avermectinas ciclo-hexil B2:ciclo-hexil B1 é de cerca de 0,25:1 ou inferior. Numa sua forma de realização não limitativa, o alelo *aveC* submetido a mutação ou uma sua variante degenerada codifica um produto gene *AveC* compreendendo uma combinação de substituições de aminoácido seleccionada de entre o grupo consistindo em de (w) a (be) acima indicados.

Numa sua forma de realização mais preferida, a proporção de avermectinas ciclo-hexil B2:ciclo-hexil B1 é de cerca de 0,20:1 ou inferior. Numa sua forma de realização não limitativa, o alelo *aveC* submetido a mutação ou uma sua variante degenerada codifica um produto gene *AveC* compreendendo uma combinação de substituições de aminoácido seleccionada de entre o grupo consistindo em de (ao) a (be) acima indicados.

O presente invento proporciona ainda um método para produzir uma nova estirpe de *Streptomyces avermitilis*, compreendendo (i) mutação do alelo *aveC* numa célula de uma

estirpe de *S. avermitilis*, mutação essa que dá origem a uma combinação de substituições de aminoácido no produto gene AveC, ou (ii) introdução para uma célula de uma estirpe de *S. avermitilis* de um alelo *aveC* submetido a mutação ou uma sua variante degenerada codificando um produto gene AveC compreendendo uma combinação de substituições de aminoácido, em que a combinação de substituições de aminoácido é seleccionada de entre o grupo consistindo em (bf) e (bg). Numa sua forma de realização preferida, células de *S. avermitilis* compreendendo um tal alelo *aveC* submetido a mutação ou uma sua variante degenerada são capazes de produzir avermectinas ciclo-hexil B2:ciclo-hexil B1 numa proporção de cerca de 0,40:1 ou inferior.

Ao submeter assim a mutação o alelo *aveC*, ou ao introduzir assim um alelo *aveC* submetido a mutação ou uma sua variante degenerada, de acordo com os passos acima indicados, é produzida uma nova estirpe de *S. avermitilis*.

O presente invento proporciona ainda uma célula de uma espécie de *Streptomyces* que compreende um alelo *aveC* submetido a mutação ou uma sua variante codificando um produto gene AveC compreendendo uma combinação de substituições de aminoácido seleccionada de entre (a) a (be) acima indicados. Numa sua forma de realização preferida, a espécie de *Streptomyces* é *S.avermitilis*.

O presente invento proporciona ainda uma célula de *S. avermitilis* capaz de produzir avermectinas ciclo-

hexil B2:ciclo-hexil B1 numa proporção de 0,35:1 ou inferior. Numa sua forma de realização não limitativa, a célula comprehende um alelo *aveC* submetido a mutação ou uma sua variante degenerada codificando um produto gene *AveC* comprendendo uma combinação de substituições de aminoácido seleccionada de entre o grupo consistindo em de (a) a (be) acima indicada.

Numa sua forma de realização preferida, a proporção de avermectinas ciclo-hexil B2:ciclo-hexil B1 é de cerca de 0,30:1 ou inferior. Numa sua forma de realização não limitativa, a célula comprehende um alelo *aveC* submetido a mutação ou uma sua variante degenerada codificando um produto gene *AveC* comprendendo uma combinação de substituições de aminoácido seleccionada de entre o grupo consistindo em de (f) a (be) acima indicado.

Numa sua forma de realização mais preferida, a proporção de avermectinas ciclo-hexil B2:ciclo-hexil B1 é de cerca de 0,25:1 ou inferior. Numa sua forma de realização não limitativa, a célula comprehende um alelo *aveC* submetido a mutação ou uma sua variante degenerada codificando um produto gene *AveC* comprendendo uma combinação de substituições de aminoácido seleccionada de entre o grupo consistindo em de (w) a (be) acima indicados.

Numa sua forma de realização mais preferida, a proporção de avermectinas ciclo-hexil B2:ciclo-hexil B1 é de cerca de 0,20:1 ou inferior. Numa sua forma de

realização não limitativa, a célula compreende um alelo *aveC* submetido a mutação ou uma sua variante degenerada codificando um produto gene AveC compreendendo uma combinação de substituições de aminoácido seleccionada de entre o grupo consistindo em de (ao) a (be) acima indicados.

O presente invento proporciona ainda uma célula de uma espécie de *Streptomyces*, compreendendo um alelo *aveC* submetido a mutação ou uma sua variante degenerada codificando um produto gene AveC compreendendo uma combinação de substituições de aminoácido seleccionada de entre o grupo consistindo em (bf) e (bg) acima indicados. Numa sua forma de realização preferida, a célula é uma célula de *S. avermitilis* capaz de produzir avermectinas ciclo-hexil B2:ciclo-hexilç B1 numa proporção de cerca de 0,40:1 ou inferior.

Embora qualquer uma das mutações indicadas possa estar presente em células do presente invento num elemento extracromossomico tal como um plasmídeo, é preferido que essas mutações estejam presentes numa sequência de codificação *aveC* integrada para o cromossoma de *S. avermitilis*, e de preferência, embora não necessariamente, no sítio do alelo *aveC* nativo.

Essas novas estirpes de células são úteis na produção em larga escala de avermectinas comercialmente desejáveis tais como doramectina.

O presente invento proporciona ainda um processo para a produção de avermectinas, compreendendo a cultura de células de *S. avermitilis* do presente invento em meios de cultura em condições que permitam ou induzam a produção de avermectinas a partir delas, e recuperando as referidas avermectinas a partir da cultura. Numa forma de realização preferida, as células usadas no processo produzem avermectinas ciclo-hexil B2:ciclo-hexil B1 numa proporção de 0,35:1 ou inferior, com maior preferência numa proporção de cerca de 0,30:1 ou inferior, com maior preferência numa proporção de cerca de 0,25:1 ou inferior, e com maior preferência numa proporção de cerca de 0,20:1 ou inferior.

Numa sua forma de realização preferida, células produzindo avermectinas ciclo-hexil B2:ciclo-hexil B1 numa proporção de 0,35:1 ou inferior compreende um alelo *aveC* submetido a mutação ou uma sua variante degenerada codificando um produto gene *AveC* compreendendo uma combinação de substituições de aminoácido seleccionada de entre o grupo consistindo em de (a) a (be) acima indicados.

Numa outra sua forma de realização preferida, células produzindo avermectinas ciclo-hexil B2:ciclo-hexil B1 numa proporção de 0,30:1 ou inferior compreende um alelo *aveC* submetido a mutação ou uma sua variante degenerada codificando um produto gene *AveC* compreendendo uma combinação de substituições de aminoácido seleccionada de entre o grupo consistindo em de (f) a (be) acima indicados.

Numa outra sua forma de realização preferida, células produzindo avermectinas ciclo-hexil B2:ciclo-hexil B1 numa proporção de 0,25:1 ou inferior compreende um alelo *aveC* submetido a mutação ou uma sua variante degenerada codificando um produto gene AveC compreendendo uma combinação de substituições de aminoácido seleccionada de entre o grupo consistindo em de (w) a (be) acima indicados.

Numa outra sua forma de realização preferida, células produzindo avermectinas ciclo-hexil B2:ciclo-hexil B1 numa proporção de 0,20:1 ou inferior compreende um alelo *aveC* submetido a mutação ou uma sua variante degenerada codificando um produto gene AveC compreendendo uma combinação de substituições de aminoácido seleccionada de entre o grupo consistindo em de (ao) a (be) acima indicados.

Numa outra sua forma de realização preferida, células produzindo avermectinas ciclo-hexil B2:ciclo-hexil B1 numa proporção de 0,40:1 ou inferior compreende um alelo *aveC* submetido a mutação ou uma sua variante degenerada codificando um produto gene AveC compreendendo uma combinação de substituições de aminoácido seleccionada de entre o grupo consistindo em (bf) e (be) acima indicados.

O processo do invento proporciona eficácia aumentada na produção de avermectinas comercialmente importantes tais como doramectina.

O presente invento proporciona ainda uma composição de avermectinas ciclo-hexil B2:ciclo-hexil B1 produzidas por células de *Streptomyces avermitilis*, compreendendo as avermectinas ciclo-hexil B2:ciclo-hexil B1 presentes num meio de cultura em que as células tenham sido cultivadas, em que a proporção das avermectinas ciclo-hexil B2:ciclo-hexil B1 presentes no meio de cultura é de 0,35:1 ou inferior, de preferência cerca de 0,30:1 ou inferior, com maior preferência cerca de 0,25:1 ou inferior, e com maior preferência cerca de 0,20:1 ou inferior. Numa forma de realização preferida, a composição de avermectinas ciclo-hexil B2:ciclo-hexil B1 é produzida por células de uma estirpe de *S. avermitilis* que expressa um alelo *aveC* submetido a mutação ou uma sua variante degenerada que codifica um produto gene que dá origem a uma redução na proporção de avermectinas ciclo-hexil B2:ciclo-hexil B1 produzidas pelas células em comparação com células da mesma estirpe de *S. avermitilis* que não expressa o alelo *aveC* submetido a mutação mas pelo contrário expressa apenas o alelo *aveC* do tipo selvagem.

Numa sua forma de realização preferida, onde a composição é constituida por avermectinas ciclo-hexil B2:ciclo-hexil B1 numa proporção de 0,35:1 ou inferior, a composição é produzida por células compreendendo um alelo *aveC* submetido a mutação ou uma sua variante degenerada codificando um produto gene *AveC* compreendendo uma combinação de substituições de aminoácido seleccionada de entre o grupo consistindo em de (a) a (be) acima indicados.

Numa sua outra forma de realização preferida, onde a composição é constituída por avermectinas ciclohexil B2:ciclo-hexil B1 numa proporção de 0,30:1 ou inferior, a composição é produzida por células compreendendo um alelo *aveC* submetido a mutação ou uma sua variante degenerada codificando um produto gene *AveC* compreendendo uma combinação de substituições de aminoácido seleccionada de entre o grupo consistindo em de (f) a (be) acima indicados.

Numa sua outra forma de realização preferida, onde a composição é constituída por avermectinas ciclohexil B2:ciclo-hexil B1 numa proporção de 0,25:1 ou inferior, a composição é produzida por células compreendendo um alelo *aveC* submetido a mutação ou uma sua variante degenerada codificando um produto gene *AveC* compreendendo uma combinação de substituições de aminoácido seleccionada de entre o grupo consistindo em de (w) a (be) acima indicados.

Numa sua outra forma de realização preferida, onde a composição é avermectinas ciclo-hexil B2:ciclo-hexil B1 numa proporção de 0,20:1 ou inferior, a composição é produzida por células compreendendo um alelo *aveC* submetido a mutação ou uma sua variante degenerada codificando um produto gene *AveC* compreendendo uma combinação de substituições de aminoácido seleccionada de entre o grupo consistindo em de (ao) a (be) acima indicados.

O presente invento proporciona ainda uma composição de avermectinas ciclo-hexil B2:ciclo-hexil B1 produzida por células de *Streptomyces avermitilis*, compreendendo as avermectinas ciclo-hexil B2:ciclo-hexil B1 presentes num meio de cultura em que as células foram cultivadas, em que a proporção de avermectinas ciclo-hexil B2:ciclo-hexil B1 presentes no meio de cultura é de cerca de 0,40:1 ou inferior, e que é produzido por células compreendendo um alelo *aveC* submetido a mutação ou uma sua variante degenerada codificando um produto gene *AveC* compreendendo uma combinação de substituições de aminoácido seleccionada de entre o grupo consistindo em (bf) e (bg) acima indicados.

Embora seja preferido que a nova composição de avermectina esteja presente num meio de cultura em que as células tenham sido cultivadas, por exemplo, em líquido de cultura de fermentação totalmente esgotado, a composição de avermectina pode de um modo alternativo ser parcialmente ou substancialmente purificada a partir do líquido de cultura por meio de técnicas bioquímicas conhecidas de purificação, tais como precipitação de sulfato de amónio, diálise, fraccionamento por tamanhos, cromatografia de permuta de iões, HPLC, etc.

Embora seja preferido que a nova composição de avermectina esteja presente num meio de cultura em que as células tenham sido cultivadas, por exemplo, em líquido de

cultura de fermentação parcialmente ou totalmente esgotado, a composição de avermectina pode de um modo alternativo ser parcialmente ou substancialmente purificada a partir do líquido de cultura por meio de técnicas bioquímicas conhecidas de purificação, tais como precipitação de sulfato de sódio, diálise, fraccionamento por tamanhos, cromatografia de permuta de iões, etc.

Para além da produção de novas estirpes de *S. avermitilis* compreendendo células que sejam capazes de produzir proporções reduzidas de ciclo-hexil B2:ciclo-hexil B1 tal como foi acima descrito, o presente invento contempla que mutações adicionais podem ser incorporadas em células de *S. avermitilis* para melhorar ainda mais características da produção de avermectina. Numa forma de realização não limitativa, células do presente invento podem ainda compreender modificações para aumentar a produção de nível de avermectinas. Numa forma de realização, essas células podem ser preparadas por (i) mutação do alelo *aveC* numa célula de *S. avermitilis*, ou (ii) introdução de um alelo *aveC* submetido a mutação ou uma sua variante degenerada em células de uma estirpe de *S. avermitilis*, em que a expressão do alelo submetido a mutação dá origem a um aumento na quantidade de avermectinas produzidas por células de uma estirpe de *S. avermitilis* expressando o alelo *aveC* submetido a mutação em comparação com células da mesma estirpe que pelo contrário expressam apenas um alelo *aveC* do tipo selvagem simples, e seleção de células transformadas que produzem avermectinas

numa quantidade aumentada em comparação com a quantidade de avermectinas produzidas por células da estirpe que pelo contrário expressa apenas o alelo *aveC* do tipo selvagem simples. Por exemplo, o alelo *aveC* pode ser modificado de modo a compreender um promotor forte, tal como o promotor *ermE* constitutivo forte a partir de *Saccharopolyspora erythraea*, inserido a montante de e em associação operativa com o ORF *aveC*. Numa outra forma de realização, uma ou mais mutações podem ser introduzidas nos genes *aveR1* e/ou *aveR2* de *S. avermilitis*, desse modo aumentando o nível de produção de avermectina tal como é descrito na Patente dos E.U.A. No. 6.197.591 de Stutzman-Engwall et al., publicada em 6 de Março de 2001.

#### **Utilizações De avermectinas**

As avermectinas são agentes antiparasitários altamente activos apresentando uma utilidade particular como anti-helmínticos, ectoparasiticidas, insecticidas e acaricidas. Compostos de avermectina produzidos de acordo com os métodos do presente invento são úteis para qualquer uma das finalidades. Por exemplo, compostos de avermectina produzidos de acordo com o presente invento são úteis para o tratamento de várias doenças ou condições em seres humanos, particularmente onde essas doenças ou condições sejam causadas por infecções por parasitas, tal como é conhecido nesta técnica. Ver, por exemplo, Ikeda and Omura, 1997, Chem. Rev. 97(7):2591-2609. Mais particularmente, compostos de avermectina produzidos de acordo com o

presente invento são eficazes no tratamento de uma série de doenças ou de condições causadas por endoparasitas, tais como nemátodos parasitários, os quais podem infectar o ser humano, animais domésticos, porcos, carneiros, aves domésticas, cavalos ou gado vacum.

Mais especificamente, compostos de avermectina produzidos de acordo com o presente invento são eficazes contra nemátodos que infectam o ser humano, assim como os que infectam várias espécies de animais. Esses nemátodos incluem parasitas gastrointestinais tais como *Ancylostoma, necator, Ascaris, Strongyloides, Trichinella, Capillaria, Trichuris, Enterobius, Dirofilaria*, e parasitas que se encontram no sangue ou outros tecidos ou órgãos, tais como vermes da filária e extracto de estados intestinais de *Strongyloides e de Trichinella*.

Os compostos de avermectina produzidos de acordo com o presente invento são também úteis no tratamento de infecções ectoparasitárias incluindo, por exemplo, infestações por artrópodos de mamíferos e pássaros, causados por carraças, ácaros, piolhos, pulgas, moscas da carne, insectos que picam, ou larvas de dípteros que podem afectar gado vacum e cavalos, entre outros.

Os compostos de avermectina produzidos de acordo com o presente invento são também úteis como insecticidas contra pragas domésticas tais como, por exemplo, baratas, traças da roupa, escaravelhos e mosca doméstica entre

outras, assim como pragas de insectos de cereais armazenados e de plantas agrícolas, cujas pragas incluem aracnídios, afídeos, lagartas, e ortopterans tais como gafanhotos, entre outros.

Animais que podem ser tratados com os compostos de avermectina produzidos de acordo com o presente invento incluem carneiros, gado vacum, cavalos, veados, cabras, porcos, pássaros incluindo aves domésticas, e cães e gatos.

Um composto de avermectina produzido de acordo com o presente invento é administrado numa formulação apropriada à utilização específica pretendida, à espécie particular de animal hospedeiro a ser tratado, e ao parasita ou insecto envolvido. Para utilização como um parasiticida, um composto avermectina produzido de acordo com o presente invento pode ser administrado por via oral sob a forma de cápsulas, bolus, comprimidos ou poção com líquidos ou, de um modo alternativo, poderá ser administrado por derrame, ou por injecção, ou como um implante. Essas formulações são preparadas de um modo conveniente de acordo com a prática veterinária padrão. Assim, cápsulas, bolus ou comprimidos podem ser preparados misturando o ingrediente activo com um diluente ou veículo finamente dividido apropriado contendo adicionalmente um agente de desintegração e/ou um agente de ligação tal como amido, lactose, talco, estearato de magnésio, etc. Uma formulação para derramar poderá ser preparada dispersando o ingrediente activo numa solução aquosa juntamente com um

agente de dispersão ou de humidificação, etc. Formulações injectáveis podem ser preparadas sob a forma de uma solução estéril, a qual poderá conter outras substâncias tais como, por exemplo, sais e/ou glucose suficientes para tornar a solução isotónica com o sangue.

Essas formulações irão variar no que se refere ao peso do composto activo dependendo do paciente, da espécie do animal hospedeiro a ser tratado, da gravidade e do tipo de infecção, e do peso corporal do hospedeiro. Geralmente, para administração por via oral uma dose do composto activo variando entre 0,001 e 10 mg em kg do peso corporal do paciente ou do animal administrada como uma dose única ou em doses divididas durante um período variando entre 1 e 5 dias será satisfatória. Contudo, poderá haver casos em que gamas de dosagem mais elevadas ou mais baixas serão indicadas, tal como é determinado, por exemplo, por um médico ou veterinário, tendo como base sintomas clínicos.

Como uma alternativa, um composto de avermectina produzido de acordo com o presente invento poderá ser administrado em combinação com a ração do animal, e para este fim um aditivo alimentar concentrado ou uma prémistura poderá ser preparado para mistura com a ração animal normal.

Para utilização como um insecticida, e para o tratamento de pragas agrícolas, um composto de avermectina produzido de acordo com o presente invento poderá ser

aplicado sob a forma de um spray, poeira, emulsão, etc., de acordo com a prática agrícola padrão.

**EXEMPLO: FERMENTAÇÃO DE STREPTOMYCES AVERMITILIS E ANÁLISES DE AVERMECTINA B2:B1**

Estirpes a que faltam tanto a desidrogenase do ácido 2-oxo de cadeia ramificada como as actividades de 5-O-metiltransferase não produzem avermectinas se o meio de fermentação não for suplementado com ácidos gordos. Este exemplo demonstra que nesses mutantes uma ampla gama de proporções B2:B1 de avermectinas poderá ser obtida quando a biosintese seja iniciada na presença de diferentes ácidos gordos.

**Materiais e Métodos**

*Streptomyces avermitilis* ATCC 53692 foi armazenado a -70° C como um caldo total preparado em meio de sementeira consistindo em: Amido (Nadex, Laing National) - 20 g; Pharmamedia (Trader's Protein, Memphis, TN) - 15 g; Ardamine pH (Yeast Products Inc.) - 5 g; carbonato de cálcio - 1 g. O volume final foi ajustado até 1 litro com água corrente, o pH foi ajustado até 7,2, e o meio foi submetido a autoclave a 121° C durante 25 minutos.

Dois ml de uma suspensão descongelada da preparação acima mencionada foram usados para inocular um frasco contendo 50 ml do mesmo meio. Após 48 horas de

incubação a 28° C num agitador rotativo a 180 rpm, 2 ml do caldo foram usados para inocular um frasco contendo 50 ml de um meio de produção consistindo em: Amido - 80 g; carbonato de cálcio - 7 g; Pharmamedia - 5 g; hidrogen fosfato de dipotássio - 1 g; sulfato de magnésio - 1 g; ácido glutâmico - 0,6 g; sulfato hepta-hidrato ferroso - 0,01 g; sulfato de zinco - 0,001 g; sulfato de manganésio - 0,001 g. O volume final foi ajustado até 1 litro com água corrente, o pH foi ajustado até 7,2, e o meio foi submetido a autoclave a 121° C durante 25 minutos.

Vários substratos de ácido carboxílico (ver QUADRO 1) foram dissolvidos em metanol e foram adicionados ao caldo de fermentação durante 24 horas após inoculação para dar origem a uma concentração final de 0,2 g/litro. O caldo de fermentação foi incubado durante 14 dias a 28° C, e em seguida o caldo foi centrifugado (2.500 rpm durante 2 minutos) e o produto flutuante foi eliminado. A pílula micelial foi extraída com acetona (15 ml), e em seguida com diclorometano (30 ml), e a fase orgânica foi separada, filtrada, sendo em seguida evaporada até à secura. O resíduo foi misturado com metanol (1 ml) e foi analisado por HPLC com um cromatógrafo líquido Hewlett-Packard 1090A equipado com um dispositivo detector de diodos de varrimento ligado para 240 nm. A coluna usada foi uma Beckman Ultrasphere C-18, 5 µm, coluna de 4,6 mm x 25 cm mantida a 40° C. Vinte e cinco µl da solução de metanol acima referida foram injectados para a coluna. A eluição foi realizada com um gradiente linear de metanol-água a

partir de 80:20 a 95:5 durante 40 minutos a 0,85/ml minutos. Duas concentrações padrão de ciclo-hexil B1 foram usadas para calibrar a resposta do detector, e foi medida a área sob as curvas para avermectinas B2 e B1.

### **Resultados**

Os tempos de retenção HPLC observados para as avermectinas B2 e B1, e as proporções 2:1, são apresentados no QUADRO 1.

**QUADRO 1**

<b>Substrato</b>	<b>Tempo Retenção HPLC (min)</b>		<b>Proporção</b>
	<b>B2</b>	<b>B1</b>	<b>B2:B1</b>
Ácido 4-tetra-hidropiranocarboxílico	8,1	14,5	0,25
Ácido isobutírico	10,8	18,9	0,5
Ácido 3-furóico	7,6	14,6	0,62
S-(+)-2-metilbutírico	12,8	21,6	1,0
Ácido ciclo-hexanocarboxílico	16,9	26,0	1,6
Ácido 3-tiofenocarboxílico	8,8	16,0	1,8
Ácido ciclopentanocarboxílico	14,2	23,0	2,0
Ácido 3-trifluorometilbutírico	10,9	18,8	3,9
Ácido 2-metilpentanóico	14,5	24,9	4,2
Ácido ciclo-heptanocarboxílico	18,6	29,0	15,0

Os dados apresentados no QUADRO 1 demonstram uma gama extremamente ampla de proporções de produto avermectinas B2:B1, indicando uma considerável diferença nos resultados de conversão desidratativa de compostos da

classe 2 para compostos da classe 1, dependendo da natureza da unidade iniciadora de cadeia lateral de ácido gordo fornecida. Isto indica que modificações nas proporções B2:B1 resultantes de alterações feitas à proteína AveC podem ser específicas para substratos particulares. Consequentemente, rastreio para mutantes apresenta modificações na proporção B2:B1 obtido com um substrato particular necessita de ser feita na presença desse substrato. Os exemplos subsequentes abaixo descritos utilizam ácido ciclo-hexanocarboxílico como o substrato de rastreio. Contudo, este substrato é usado meramente para exemplificar o potencial, e não pretende limitar a capacidade de aplicação, do presente invento.

**EXEMPLO: ISOLAMENTO DO GENE aveC**

Este exemplo descreve o isolamento e caracterização de uma região do cromossoma de *Streptomyces avermitilis* que codifica o produto gene AveC. Tal como é demonstrado mais abaixo, o gene aveC foi identificado como sendo capaz de modificar a proporção de avermectinas ciclohexil-B2 a ciclo-hexil-B1 (B2:B1) produzidas.

**7.1. Materiais e Métodos****7.1.1. Crescimento De *Streptomyces* Para Isolamento de DNA**

O método que se segue foi seguido para crescimento de *Streptomyces*. Colónias simples de *S. avermitilis*

ATCC 31272 (isolado de colónia simples #2) foram isoladas em YPD-6 de intensidade  $\frac{1}{2}$  contendo: Difco Extracto de Levedura - 5 g; Difco Bacto-peptona - 5 g; dextrose - 2,5 g; MOPS - 5 g; Difco Bacto agar - 15 g. O volume final foi ajustado para 1 litro com dH<sub>2</sub>O, o pH foi ajustado para 7,0, e o meio foi submetido a autoclave a 121° C durante 25 minutos.

Micélios feitos crescer no meio acima indicado foram usados para inocular 10 ml de meio TSB (Difco Tryptic Soy Broth - 30 g, em 1 litro dH<sub>2</sub>O, foram submetidos a autoclave a 121° C durante 25 minutos) num tubo de 25 mm x 150 mm que foi mantido com agitação (300 rpm) a 28° C durante 48-72 horas.

#### **7.1.2. Isolamento De DNA Cromossómico A Partir De Streptomyces**

Porções alíquotas (0,25 ml ou 0,5 ml) de micélios feitos crescer tal como foi acima descrito foram colocados em tubos de microcentrifuga de 1,5 ml e as células foram concentradas por centrifugação a 12.000 x g durante 60 segundos. O produto flutuante foi eliminado e as células foram suspensas de novo em 0,25 ml de tapão TSE (20 ml de sucrose 1,5 M, 2,5 ml de Tris-HCl 1 M, pH 8,0, 2,5 ml de EDTA 1 M, pH 8,0, e 75 ml dH<sub>2</sub>O) contendo 2 mg/ml de lisozima. As amostras foram incubadas a 37° C durante 20 minutos com agitação, foram carregadas para um instrumento de isolamento de ácido nucleico automático AutoGen 540 TM (Integrated Separation Systems, Natick, MA), e DNA genómico

isolado usando Cycle 159 (equipamento software) de acordo com as instruções do fabricante.

De um modo alternativo, 5 ml de micélios foram colocados num tubo de 17 mm x 100 mm, as células foram concentradas por centrifugação a 3.000 rpm, e o produto flutuante foi removido. As células foram suspensas de novo em 1 ml de tampão TSE, concentradas por centrifugação a 3.000 rpm durante 5 minutos, e o produto flutuante foi removido. As células foram suspensas de novo em 1 ml de tampão TSE contendo 2 mg/ml de lisozima, e foram incubadas a 37° C com agitação durante 30-60 minutos. Após incubação, 0,5 ml de dodecil sulfato de sódio (SDS) foi adicionado e as células foram incubadas a 37° C até a lise ficar completa. O produto da lise foi incubado a 65° C durante 10 minutos, foi arrefecido até à temperatura ambiente, foi dividido entre dois tubos Eppendorf de 1,5 ml, e extraído 1 x com 0,5 ml de fenol/clorofórmio (50% de fenol previamente equilibrada com Tris 0,5 M, pH 8,0; 50% de clorofórmio). A fase aquosa foi removida e extraída 2 a 5x com clorofórmio:alcool isoamílico (24:1). O DNA foi precipitado por adição 1/10 volume de acetato de sódio 3 M, pH 4,8, incubando a mistura sobre gelo durante 10 minutos, centrifugando a mistura a 15.000 rpm a 5° C durante 10 minutos, e removendo o produto flutuante para um tubo ao qual se adicionou 1 volume de isopropanol. A mistura do produto flutuante mais isopropanol foi então incubada sobre gelo durante 20 minutos, foi centrifugada a 15.000 rpm durante 20 minutos a 5° C, o produto flutuante foi

removido, e a pílula de DNA foi lavada 1x com etanol a 70%. Depois da pílula ficar seca, o DNA foi suspenso de novo em tampão TE (Tris 10 mM, EDTA 1 mM, pH 8,0).

#### **7.1.3. Isolamento De DNA De Plasmídeo A Partir De *Streptomyces***

Uma porção aliquota (1,0 ml) de micélios foi colocada em tubos de microcentrifuga de 1,5 ml e as células foram conventradas por centrifugação a 12.000 x g durante 60 segundos. O produto flutuante foi eliminado, as células foram suspensas de novo em 1,0 ml de sucrose a 10,3% e concentradas por centrifugação a 12.000 x g durante 60 segundos, e o produto flutuante foi eliminado. As células foram então suspensas de novo em 0,25 ml de tampão TSE contendo 2 mg/ml de lisozima, e foram incubadas a 37° C durante 20 minutos com agitação e foram carregadas para o instrumento de isolamento de ácido nucleico automatizado AutoGen 540™ . DNA de plasmídeo foi isolado usando Cycle 106 (equipamento software) de acordo com as instruções do fabricante.

De um modo alternativo, 1,5 ml de micélios foram colocados em tubos de microcentrifuga de 1,5 ml e as células foram concentradas por centrifugação a 12.000 x g durante 60 segundos. O produto flutuante foi eliminado, as células foram suspensas de novo em 1,0 ml de sucrose a 10,3% e concentradas por centrifugação a 12.000 x g durante 60 segundos, e o produto flutuante foi eliminado. As

células foram suspensas de novo em 0,5 ml de tampão TSE contendo 2 mg/ml de lisozima, e foram incubadas a 37° C durante 15-30 minutos. Após incubação, foi adicionado 0,25 ml de SDS alcalino (NaOH 0,3N, 2% de SDS) e as células foram incubadas a 55° C durante 15-30 minutos ou até a solução ficar transparente. Acetato de sódio (0,1 ml, 3M, pH 4,8) foi adicionado à solução de DNA, que foi então incubada em gelo durante 10 minutos. As amostras de DNA foram centrifugadas a 14.000 rpm durante 10 minutos a 5° C. O produto flutuante foi removido para um tubo limpo, e 0,2 ml de fenol:clorofórmio (50% de fenol:50% de clorofórmio) foi adicionado e foi misturado suavemente. A solução de DNA foi centrifugada a 14.000 rpm durante 10 minutos a 5° C e a camada superior foi removida para um tubo Eppendorf limpo. Foi adicionado isopropanol (0,75 ml), e a solução foi misturada suavemente sendo em seguida incubada à temperatura ambiente durante 20 minutos. A solução de DNA foi centrifugada a 14.000 rpm durante 15 minutos a 5° C, o produto flutuante foi removido, e a pílula de DNA foi lavada com etanol a 70%, foi seca, e suspensa de novo em tampão TE.

**Isolamento De AND De Plasmídeo A Partir De *E.coli***

Uma única colónia de *E. coli*. Transformada foi inoculada em 5 ml de meio Luria-Bertani (LB) (Bacto-Tryptone - 10 g, extracto de levedura Bacto - 5 g, e NaCl - 10 g em 1 litro de dH<sub>2</sub>O, pH 7,0, submetidos a autoclave a 121° C durante 25 minutos, e suplementados com 100 µg/,l

de ampicilina). A cultura foi incubada durante a noite, e uma porção alíquota de 1 ml foi colocada num tubo de microcentrifuga de 1,5 ml. As amostras da cultura foram carregadas para o instrumento de isolamento de ácido nucleico automático AutoGen 540<sup>TM</sup> usando Cycle 3 (equipamento de software) de acordo com instruções do fabricante.

**Preparação e Transformação De Protoplastos de S. avermitilis**

Colónias simples de *S. avermitilis* foram isoladas em YPD de força ½. Os micélios foram usados para inocular 10 ml de meio TSB num tubo de 25 mm x 150 mm, o qual foi então incubado com agitação (300 rpm) a 28° C durante 48 horas. Um ml de micélios foi usado para inocular 50 ml de meio YEME. O meio YEME contém por litro: Extracto de Levedura Difco - 3 g; Bacto-peptona Difco - 5 g; Extracto de Malte Difco - 3 g; Sucrose - 300 g. Após autoclave a 121° C durante 25 minutos, foram adicionados os que se seguem: MgCl<sub>2</sub> 2,5 M . 6H<sub>2</sub>O (submetidos a autoclave separadamente a 121° C durante 25 minutos) - 2 ml; e glicina (20%) (esterilizados por filtração)-25 ml.

Os micélios foram feitos crescer a 30° C durante 48-72 horas e foram colhidos por centrifugação num tubo de centrifuga de 50 ml (Falcon) a 3.000 rpm durante 20 minutos. O produto flutuante foi eliminado e os micélios foram suspensos de novo em tampão P, que contém: sucrose -

205 g:  $K_2SO_4$  - 0,25 g;  $MgCl_2 \cdot 6H_2O$  - 2,02 g;  $H_2O$  - 600 ml;  $K_2PO_4$  (0,5%) - 10 ml; solução de elemento vestigial - 20 ml;  $CaCl_2 \cdot 2H_2O$  (3,68%) - 100 ml; e tampão MES (1,= M, pH 6,5) - 10 ml. (A solução de elementos vestigiais contém por litro:  $ZnCl_2$  - 40 mg;  $FeCl_3 \cdot 6H_2O$  - 200 mg;  $CuCl_2 \cdot 2H_2O$  - 10 mg;  $MnCl_2 \cdot 4H_2O$  - 10 mg;  $Na_2B_4O_7 \cdot 10H_2O$  - 10 mg;  $(NH_4)_6Mo_7O_24 \cdot 4H_2O$  - 10 mg). O pH foi ajustado para 6,5, o volume final foi ajustado para 1 litro, e o meio foi filtrado a quente através de um filtro de 0,45 micron.

Os micélios foram reduzidos a pílula a 3.000 rpm durante 20 minutos, o produto flutuante foi eliminado, e os micélios foram suspensos de novo em 20 ml de tampão P contendo 2 mg/ml de lisozima. Os micélios foram incubados a 35° C durante 15 minutos com agitação, e foram rastreados microscopicamente para determinar a grau de formação de protoplasto. Quando a formação de protoplasto ficou completa, os protoplastos foram centrifugados a 8.000 rpm durante 10 minutos. O produto flutuante foi removido e os protoplastos foram suspensos de novo em 10 ml de tampão P. Os protoplastos foram centrifugados a 8.000 rpm durante 10 minutos, o produto flutuante foi removido, os protoplastos foram suspensos de novo em 2 ml de tampão P, e aproximadamente  $1 \times 10^9$  de protoplastos foram distribuidos para 2,0 ml de frascos criogénicos (Nalgene).

Um frasco contendo  $1 \times 10^9$  de protoplastos foi centrifugado a 8.000 rpm durante 10 minutos, o produto flutuante foi removido, e os protoplastos foram suspensos

de novo em 0,1 ml de tampão P. Dois a 5  $\mu$ g de DNA de transformação foram adicionados aos protoplastos, imediatamente seguidos pela adição de 0,5 ml de tampão P em ação. A base de tampão P contém: PEG-1000 (Sigma) - 25 g; sucrose - 2,5 g;  $\text{H}_2\text{O}$  - 83 ml. O pH foi ajustado para 8,8 com NaOH 1 N (esterilizado por filtração), e a base de tampão P foi esterilizada por filtração e foi armazenada a 4° C. Tampão T em ação, feito no mesmo dia que foi usado, foi base de tampão T - 8,3 ml;  $\text{K}_2\text{PO}_4$  (4 mM) - 1,0 ml;  $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  (5 M) - 0,2 ml; e TES (1 M, pH 8) - 0,5 ml. Cada componente do tampão T em ação foi individualmente esterilizado por filtração.

20 segundos após a adição de tampão T aos protoplastos, 1,0 ml de tampão P foi também adicionado e os protoplastos foram centrifugados a 8.000 rpm durante 10 minutos. O produto flutuante foi eliminado e os protoplastos foram suspensos de novo em 0,1 ml de tampão P. Os protoplastos foram então colocados em placas com meio RM14, que contém: sucrose - 205 g;  $\text{K}_2\text{SO}_4$  - 0,25 g;  $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$  - 10,12 g; glucose - 10 g; Difco Casamino Acids - 0,1 g; Extracto de levedura Difco - 5 g; Difco Oatmeal Agar - 3 g; Difco Bacto Agar - 22 g;  $\text{dH}_2\text{O}$  - 800 ml. A solução foi submetida a autoclave a 121° C durante 25 minutos. Após autoclave, foram adicionados lotes estéreis do que se segue:  $\text{K}_2\text{PO}_4$  (0,5%) - 10 ml;  $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  (5 M) - 5 ml; L-prolina (20%) - 15 ml; tampão MES (1,0 M, pH 6,5) - 10 ml; solução de elementos vestigiais (tal como acima) - 2 ml; lote de ciclo-heximida (25 mg/ml) - 40 ml; e NaOH 1N - 2

ml. Vinte e cinco ml de meio RM14 foram divididos em porções alíquotas por placa, e as placas foram secas durante 24 horas antes da sua utilização.

Os protoplastos foram incubados em humidade a 95% a 30° C durante 20-24 horas. Para seleccionar transformantes resistentes a tiostrepton, 1 ml de tampão recoberto contendo 125 µg por ml de tiostrepton foi espalhado de um modo uniforme sobre as placas de regeneração RM14. O tampão recoberto contem por 100 ml: sucrose - 10,3 g; solução de elementos vestigiais (tal como acima) - 0,2 ml; e MES (1 M, pH 6,5) - 1 ml. Os protoplastos foram incubados em 95% de humidade a 30° C durante 7-14 dias até se tornarem visíveis colónias resistentes a tiostrepton (Thio's).

#### Transformação De Protoplastos De *Streptomyces lividans*

*S. lividans* TK64 (proporcionado pelo John Innes Institute, Norwich, U.K.) foi usado para transformações nalguns casos. Métodos e composições para fazer crescer, formar protoplastos, e transformar *S. lividans* são descritos em Hopwood et al., 1985, Genetic Manipulation of Streptomyces, A Laboratory Manual, John Innes Foundation, Norwich, U.K., e foram realizados tal como foi ali descrito. O DNA do plasmídeo foi isolado a partir de transformantes de *S. lividans* tal como foi acima descrito na Secção 7.1.3.

**Análise De Fermentação De Estirpes De *S. avermitilis***

Micélios de *S. avermitilis* feitos crescer em YPD-6 com uma força de  $\frac{1}{2}$  durante 4-7 dias foram inoculados para tubos de 1 x 6 polegadas contendo 8 ml de meio preformado e duas pérolas de vidro de 5 mm. O meio preformado contém: amido solúvel (amido submetido a ebulição delgado ou KOSO, Japan Corn Starch Co., Nagoya) - 20 g/l; Pharmacia - 15 g/l; Ardamine Ph - 5 g/l (Champlain Ind., Clifton, NJ);  $\text{CaCO}_3$  - 2 g/l; 2 x bcfa ("bcfa" refere-se a ácidos gordos de cadeia ramificada) contendo uma concentração final no meio de 50 ppm de ácido 2-(+/-)-metil butírico, e 20 ppm de ácido isovalérico. O pH foi ajustado para 7,2, e o meio foi submetido a autoclave a 121° C durante 25 minutos.

O tubo foi agitado num angulo de 17° a 215 rpm a 29° C durante 3 dias. Uma porção alíquota de 2 ml da cultura da sementeira foi usada para inocular um frasco de Erlenmeyer de 300 ml contendo 25 ml de meio de produção que contém: amido (amido submetido a ebulição delgado ou KOSO) - 160 g/l; Nutrisoy (Archer Daniels Midland, Decatur, IL) - 10 g/l; Ardamine pH - 10 g/l;  $\text{K}_2\text{HPO}_4$  - 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;  $\text{MnCl}_2$  - 0,002 g/l;  $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  - 0,002 g/l;  $\text{CaCO}_3$  - 14 g/l; 2x bcfa (tal como acima); e ácido ciclo-hexano carboxílico (CHC) (produzido como uma solução a 20% com um pH 7,0) - 800 ppm. O pH foi ajustado para 6,9, e o meio foi submetido a autoclave a 121° C durante 25 minutos. (Tal como foi acima explicado, unidades iniciadoras diferentes de CHC poderão ser utilizadas em sua substituição (ver, por exemplo, Quadro 1)).

Após inoculação, o frasco foi incubado a 29° C durante 12 dias com agitação a 200 rpm. Após incubação, uma amostra de 2 ml foi retirada do frasco, foi diluída com 8 ml de metanol, misturada, e a mistura foi centrifugada a 1.250 x g durante 10 minutos até se obterem detritos de pílulas. O produto flutuante foi então ensaiado por HPLC usando uma coluna Beckman Ultrasphere ODS (25 cm x 4,6 mm ID) com uma taxa de fluxo de 0,75 ml/min e detecção por absorvência a 240 nm. A fase móvel foi constituída por 86/8,9/5,1 metanol/água/acetonitrilo.

#### **Isolamento De Genes PKS De *S. avermitilis***

Uma biblioteca de cosmídeos do DNA cromossómico de *S. avermitilis* (ATCC 31272, SC-2) foi preparado e hibridizado com uma sonda cetosintase (KS) formada a partir de um fragmento do gene sintase poliketido de *Saccharopolyspora erythraea* (PKS). Uma descrição detalhada da preparação de bibliotecas de cosmidios pode ser encontrada em Sambrook *et al.*, 1989, acima referido. Uma descrição detalhada da preparação de bibliotecas de DNA cromossómico de *Steptomyces* é apresentado em Hopwood *et al.*, 1985, acima referido. Clones de cosmídeos contendo cetosintase-regiões de hibridização foram identificados por hibridização até 2,7 Kb de um fragmento de *NdeI/Eco47III* a partir de pEX26 (gentilmente fornecido por Dr. P. Leadlay, Cambridge, UK). Aproximadamente 5 ng de pEX26 foram digeridos usando *NdeI* e *Eco47III*. A mistura da

reacção foi carregada para um gel de agarose SeaPlaque GTG a 0,8% (FMC BioProducts, Rockland, ME). O fragmento 2,7 Kb NdeI/Eco47III foi excisado a partir do gel após electroforese e o DNA recuperado a partir do gel usando GELase™ a partir de Epicentre Technologies usando o Fast Protocol. O fragmento 2,7 kb NdeI/Eco47III foi marcado com [ $\alpha$ -<sup>32</sup>P]dCTP (5'-trifosfato de desoxicitidina, sal tetra(trietilamónio), [ $\alpha$ -<sup>32</sup>P]-) (NEN-Dupont, Boston, MA) usando o BRL Nick Translation System (BRL Life Technologies, Inc., Gaithersburg, MD) seguindo as instruções do fornecedor. Uma reacção típica foi realizada em 0,05 ml de volume. Após adição de 5  $\mu$ l de tampão Stop, o DNA marcado foi separado a partir de nucleótidos não incorporados usando um G-25 Sephadex Quick Spin™ Column (Boehringer Mannheim) seguindo as instruções do fornecedor.

Aproximadamente 1.800 clones de cosmídeos foram rastreados por hibridização de colónia. Foram identificados dez clones que hibridizaram fortemente para a sonda *Sacc. Erythraea* KS. Colónias de DNA contendo DNA de cosmídeo foram feitas crescer em meio líquido LB e DNA de cosmídeo foi isolado a partir de cada cultura no instrumento de isolamento de ácido nucleico automatizado AutoGen 540™ usando Cycle 3 (equipamento de software) de acordo com as instruções do fabricante. As análises fazendo mapas da endonuclease de restrição e de hibridização de mancha Southern revelaram que cinco dos clones continham regiões cromossómicas sobrepostas. Um mapa de restrição *Bam*HI genómico de *S. avermitilis* dos cinco cosmídeos (isto é,

pSE65, pSE66, pSE67, pSE68, pSE69) foi construído por análise de cosmídios sobrepostos e hibridizações (FIGURA 4).

#### **7.1.9. Identificação De DNA Que Modula Proporções De Avermectinas B2:B1 E Identificação De Um ORF aveC**

Os métodos que se seguem foram usados para testar fragmentos subclonados derivados do clone de cosmídeo pSE66 quanto à sua capacidade para modular proporções de avermectinas B2:B1 em mutantes AveC. PSE66 (5 µg) foi digerido com *SacI* e *BamHI*. A mistura da reacção foi carregada para um gel de agarose SeaPlaque™ GTG a 0,8% (FMC BioProducts), um fragmento 2,9 Kb *SacI/BamHI* foi excisado a partir do gel após electroforese, e o DNA foi recuperado a partir do gel usando GELase™ (Epicentre Technologies) usando o Fast Protocol. Aproximadamente 5 µg do vector de rearranjo pWHM3 (Vara *et al.*, 1989, *J. Bacteriol.* **171**:5872-5881) foram digeridos com *SacI* e *BamHI*. Cerca de 0,5 µg do produto inserido 2,9 Kb e 0,5 µg do pWHM3 digerido foram misturados um com o outro e foram incubados durante a noite com 1 unidade de ligase (New England Biolabs, Inc., Beverly, MA) a 15° C, num volume total de 20 µl, de acordo com as instruções do fornecedor. Após incubação, 5 µl da mistura de ligação foram incubados a 70° C durante 10 minutos, foram arrefecidos até à temperatura ambiente, e usados para transformar células DH5α de *E. coli* (BRL) de acordo com as instruções do fabricante. O DNA do plasmídeo foi isolado a partir de

transformantes resistentes à ampicilina e a presença do elemento inserido 2,9 Kb *SacI/BamHI* foi confirmada por análise de restrição. Este plasmídeo foi designado como pSE119.

Protoplastos da estirpe de *S. avermitilis* 1100-SC38 (estirpe in-house Pfizer) foram preparados e transformados com pSE119 tal como foi acima descrito na Secção 7.1.5. A estirpe 1100-SC38 é um mutante que produz uma quantidade mais significativa de avermectina da forma ciclo-hexil-B2 em comparação com a forma de avermectina ciclo-hexil-B1 quando suplementada com ácido ciclo-hexano carboxílico (B2:B1 de cerca de 30:1). PSE119 usado para transformar protoplastos de *S. avermitilis* foi isolado a partir da estirpe GM2163 de *E. coli* GM2163 (obtida a partir de Dr. J. Bachmann, Curator, *E. coli* Genetic Stock Center, Yale University), estirpe *E. coli* DM1 (BRL), ou estirpe *S. lividans* TK64. Agentes de transformação resistentes a tiostrepton da estirpe 1100-Sc38 foram isolados e analisados por análise HPLC de produtos de fermentação. Os transformantes da estirpe 1100-SC38 de *S. avermitilis* contendo pSE119 produziram uma proporção alterado de avermectinas ciclo-hexil-B2:ciclo-hexil-B1 de cerca de 3,7:1 (QUADRO 2).

Tendo estabelecido que pSE119 era capaz de modular proporções de avermectinas B2:B1 num mutante AveC, o DNA do elemento inserido foi sequenciado. Aproximadamente  $\mu$ g de pSE119 foram isolados usando um

estojo de isolamento de DNA de plasmídeo (Qiagen, Valencia, CA) seguindo as instruções do fabricante, e fazendo a sequência usando ABI 373A Automated DNA Sequencer (Perkin Elmer, Foster City, CA). Os dados da sequência foram reunidos e editados usando programas do Genetic Computer Group (GCG, Madison, WI). A sequência de AND e o aveC ORF são apresentados na FIGURA 1 (SEQ ID NO:1).

Um novo plasmídeo, designado como pSE118, foi construído como se segue. Aproximadamente 5 µg de pSE66 foram digeridos com *Sph*I e *Bam*HI. A mistura da reacção foi carregada num gel de agarose SeaPlaque GTG a 0,8% (FMC BioProducts), um fragmento 2,8 Kb *Sph*I/*Bam*HI foi excisado a partir do gel após electroforese, e o DNA foi recuperado a partir do gel usando GELase™ (Epicentre Technologies) usando o Fast protocol. Aproximadamente 5 µg do vector de lançamento pWHD3 foram digeridos com *Sph*I e *Bam*HI. Cerca de 0,5 µg do elemento de inserção 2,8 Kb e 0,5 µg de pWHD3 digerido foram misturados um com o outro e incubados durante a noite com 1 unidade de ligase (New England Biolabs) a 15° C num volume total de 20 µl de acordo com as instruções do fornecedor. Após incubação, 5 µl da mistura de ligação foram incubados a 70° C durante 10 minutos, foram arrefecidos até à temperatura ambiente, e foram usados para transformar células competentes de *E. coli* DH5α de acordo com as instruções do fabricante. O DNA do plasmídeo foi isolado a partir de transformantes resistentes a ampicilina, e a presença do elemento de inserção 2,8 Kb *Sph*I/*Bam*HI foi confirmada por análise de

restrição. O plasmídeo foi designado como pSE118. O DNA do elemento inserido em pSE118 e pSE119 sobrepõem-se em aproximadamente 833 nucleótidos (FIGURA 4).

Protoplastos da estirpe de *S. avermitilis* 1100-SC38 foram transformados com pSE118 como foi acima referido. Agentes de transformação resistentes a tiostrepton da estirpe 1100-SC38 foram isolados e analisados por análise HPLC de produtos de fermentação. Agentes de transformação da estirpe de *S. avermitilis* da estirpe 1100-SC38 contendo pSE118 não foram alterados nas proporções de avermectina ciclo-hexil-B2: avermectina ciclo-hexil-B1 em comparação com a estirpe 1100-SC38 (QUADRO 2).

**Amplificação De PCR Do Gene aveC A Partir De AND De Cromossoma de *S. avermitilis***

Um fragmento ~1,2 Kb contendo o ORF aveC foi isolado a partir do DNA cromossómico por amplificação PCR usando iniciadores designados tendo como base a sequência de nucleótidos do aveC acima obtida. Os iniciadores PCR foram fornecidos por Genosys Biotechnologies, Inc. (Texas). O iniciador para a direita foi: 5'-TCACGAAACCGGACACAC-3' (SEQ ID NO:6); e o iniciador para a esquerda foi: 5'-CATGATCGCTGAACCGAG-3' (SEQ ID NO:7). A reacção PCR foi realizada com polimerase Deep Vent™ (New England Biolabs) em tampão proporcionado pelo fabricante, e na presença de 300 µM dNTP, 10% de glicerol, 200 pmol de cada iniciador, 0,1 µg de template (padrão), e 2,5 unidades de enzima num

volume final de 100  $\mu$ l, usando um agente de ciclo térmico Perkin-Elmer Cetus. O perfil térmico do primeiro ciclo foi de 95° C durante 5 minutos (passo de desnaturação), 60° C durante 2 minutos (passo de recozimento), e 72° C durante 2 minutos (passo de extensão). Os subsequentes 24 ciclos tinham um perfil térmico semelhante exceptuando o facto do passo de desnaturação ser encurtado para 45 segundos e o passo de recozimento ser encurtado para 1 minuto.

O produto PCR foi submetido a electroforese num gel de agarose a 1% e foi detectada uma banda de AND de ~1,2 Kb. Este DNA foi purificado a partir do gel, e foi ligado com 25 ng de vector pCR-Blunt (Invitrogen) atenuado, linearizado numa proporção de vector para elemento inserido de 1:10 seguindo as instruções do fabricante. A mistura de ligação foi usada para transformar células de *E. coli* One Shot<sup>TM</sup> Competent (Invitrogen), seguindo as instruções do fabricante. O DNA do plasmídeo foi isolado a partir de transformantes resistentes a ampicilina, e a presença do elemento inserido ~1,2 Kb foi confirmada por análise de restrição. O plasmídeo foi designado como pSE179.

O DNA do elemento inserido a partir de pSE179 foi isolado por digestão com *Bam*HI/*Xba*I, separado por electroforese, purificado a partir do gel, e ligado com vector de rearranjo pWHM3, o qual tinha sido digerido com *Bam*HI/*Xba*I, numa concentração total de DNA de 1  $\mu$ g numa proporção vector para elemento inserido molar. A mistura de

ligação foi usada para transformar células DH5 $\alpha$  de *E. coli* competente de acordo com as instruções do fabricante. O DNA do plasmídeo foi isolado a partir de transformantes resistentes a ampicilina e a presença de elemento de inserção ~1,2 Kb foi confirmado por análise de restrição. Este plasmídeo, que foi designado como pSE186 (FIGURA 2, ATCC 209604), foi transformado em *E. coli* DM1, e o DNA do plasmídeo foi isolado a partir de transformantes resistentes a ampicilina.

### **Resultados**

Um fragmento SacI/BamHI 2,9 Kb a partir de pSE119 foi identificado o qual, quando transformado em estirpe *S. avermitilis* 1100-SC38, alterou de um modo significativo a proporção de produção de avermectinas B2:B1. A estirpe de *S. avermitilis* 1100-SC38 tem normalmente uma proporção B2:B1 de cerca de 30:1, mas quando transformado com um vector compreendendo o fragmento SacI/BamHI 2,9 Kb, a proporção de avermectinas B2:B1 diminuiu até cerca de 3,7:1. Análise pós-fermentação de celulas transformantes verificou a presença do DNA de transformação.

O fragmento pSE119 2,9 Kb foi sequenciado e um ORF ~0,9 Kb foi identificado (FIGURA 1) (SEQ ID NO:1), que abrange um fragmento PstI/SphI que tinha sido previamente submetido a mutação noutro local para produzir apenas produtos B2 (Ikeda et al., 1995, acima referidos). Uma comparação deste ORF, ou seu polipeptideo deduzido

correspondente, contra dados de base conhecidos (GenEMBL, SWISS-PROT) não revelou qualquer homologia conhecida com DNA conhecido ou sequências de proteína.

O QUADRO 2 apresenta a análise de fermentação da estirpe *S. avermitilis* 1100-SC38 transformada com vários plasmídeos.

#### QUADRO 2

Estirpe <i>S. avermitilis</i> (transformando plasmídeo)	No. Agentes transformação testados	Proporção Médio B1:B2
1100-SC38 (nenhum)	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

#### EXEMPLO: CONSTRUÇÃO DE MUTANTES AveC De *S. AVERMITILIS*

Este exemplo descreve a construção de vários diferentes mutantes de AveC de *S. avermitilis* diferentes usando as composições e métodos acima descritos. Uma descrição geral de técnicas para introdução de mutações num gene em *Streotomyces* é descrito por Kieser and Hopwood, 1991, Meth. Enzym. 204:430-458. Uma descrição mais detalhada é proporcionada por Anzai et al., 1988, J. Antibiot. XLI(2):226-233, e por Stutzman-Engwall et al., 1992, J. Bacteriol. 174(1):144-154. Estas referências são aqui incorporadas como referência na sua totalidade.

**Inactivação Do Gene *aveC* De *S. avermitilis***

Mutantes *Avec* contendo genes *aveC* inactivados foram construídos usando vários métodos, tal como é descrito detalhadamente mais abaixo.

No primeiro método, um fragmento interno *SphI/PstI* 640 bp para o gene *aveC* em pSE119 (plasmídeo descrito na Secção 7.1.9, acima referida) foi substituído com o gene *ermE* (para resistência a eritromicina) a partir de *Sacc. Erythraea*. O gene *ermE* foi isolado a partir de PIJ4026 (proporcionado pelo John Innes Institute, Norwich, U.K.; ver também Bibb *et al.*, 1985, *Gene* 41:357-368) por digestão de enzima de restrição com *Bg/II* e *EcoRI*, seguida por electroforese, e foi purificado a partir do gel. Este fragmento ~1,7 Kb foi ligado para pGEM7zf (Promega) que tinha sido digerido com *BamHI* e *EcoRI*, e a mistura da ligação foi transformada em células competentes de *E. coli* DH5 $\alpha$  seguindo as instruções do fabricante. O DNA de plasmídeo foi isolado a partir de transformantes resistentes a ampicilina, e a presença do elemento de inserção ~1,7 Kb foi confirmado por análise de restrição. Este plasmídeo foi designado como pSE27.

PSE118 (descrito na Secção 7.1.9, acima referido) foi digerido com *SphI* e *BamHI*, o produto digerido foi submetido a electroforese, e o elemento inserido *SphI/BamHI* ~2,8 Kb foi purificado a partir do gel. PSE119 foi digerido

com *PstI* e *EcoRI*, o produto digerido foi submetido a electroforese, e o elemento de inserção *PstI/EcoRI* ~1,5 Kb foi purificado a partir do gel. O vector de rearranjo pWHM3 foi digerido com *BamHI* e *EcoRI*. PSE27 foi digerido com *PstI* e *SphI*, o produto digerido foi submetido a electroforese, e o elemento inserido *PstI/SphI* ~1,7 Kb foi purificado a partir do gel. Os quatro fragmentos (isto é, ~2,8 Kb, ~1,5Kb, ~7,2Kb, ~1,7Kb) foram ligados uns aos outros numa ligação de 4 vias. A mistura de ligação foi transformada nas células competentes de *E. coli* DH5 $\alpha$  seguindo as instruções do fabricante. O DNA do plasmídeo foi isolado a partir de transformantes resistentes a ampicilina, e a presença do elemento de inserção correcto foi confirmado por análise de restrição. Este plasmídeo foi designado como pSE180 (FIGURA 3; ATCC 209605).

PSE180 foi transformado em *S. lividans* TK64 e colónias transformadas identificadas por resistência a tiostrepton e eritromicina. PSE180 foi isolado a partir de *S. lividans* e foi usado para transformar protoplastos de *S. avermitilis*. Quatro transformantes de *S. avermitilis* resistentes a tiostrepton foram identificados, e protoplastos foram preparados e colocados em placa em condições não selectivas nos meios RM14. Depois de os protoplastos se regenerarem, colónias simples foram rastreadas quanto à presença de resistência a eritromicina e a ausencia de resistência a tiostrepton, indicando integração cromossómica do gene aveC inactivado e perda do replicon livre. Um transformante *Erm*<sup>r</sup> *Tio*<sup>s</sup> foi identificado

é designado como estirpe SE180-11. DNA cromossómico total foi isolado a partir da estirpe SE180-11, foi digerido com enzimas de restrição *Bam*HI, *Hind*III, *Pst*I, ou *Sph*I, separados por electroforese num gel de agarose a 0,8%, transferido para membranas de nylón, e hibridizado para a sonda *ermE*. Estas análises revelaram que a integração cromossómica do gene de resistência *ermE*, e concomitante deleção do fragmento *Pst*I/*Sph*I 640 bp tinham ocorrido por um evento cruzado duplo. Análise HPLC de produtos de fermentação da estirpe SE180-11 revelou que avermectinas normais tinham deixado de ser produzidas (FIGURA 5A).

Num segundo método para inactivar o gene *aveC*, o gene *ermE* 1,7 Kb foi removido a partir do cromossoma da estirpe *S. avermitilis* SE180-11, deixando uma deleção *Pst*I/*Sph*I 640 bp no gene *aveC*. Um plasmídeo de substituição de gene foi construído como se segue: pSE180 foi parcialmente digerido com *Xba*I e um fragmento ~11,4 Kb purificado a partir de gel. À banda ~11,4 Kb falta o gene de resistência *ermE* 1,7 Kb. O DNA foi então ligado e transformado em células de *E. coli* DH5 $\alpha$ . O DNA de plasmídeo foi isolado a partir de transformantes resistentes a ampicilina e a presença do elemento inserido correcto foi confirmado por análise de restrição. Este plasmídeo, que foi designado como pSE184, foi transformado em *E. coli* DM1, e DNA de plasmídeo foi isolado a partir de transformantes resistentes a ampicilina. Este plasmídeo foi usado para transformar protoplastos da estirpe *S. avermitilis* SE180-11. Protoplastos foram preparados a

partir de transformantes resistentes a tiostrepton de estirpe SE180-11 e foram colocados em placas como colónias simples em RM14. Depois dos protoplastos se regenerarem, colónias simples foram rastreadas quanto a ausencia de ambas a resistência a eritromicina e resistência a tiostrepton, indicando integração cromossómica do gene *aveC* inactivado e perda do replicon livre contendo gene *ermE*. Um transformante *Erm<sup>s</sup> Tio<sup>s</sup>* foi identificado e designado como SE184.1.13. A análise de fermentação de SE184-1-13 revelou que as avermectinas normais não foram produzidas e que SE184-1-13 tinha o mesmo perfil de fermentação que SE180-11.

Num terceiro método para inactivação do gene *aveC*, foi introduzido um frameshift (desvio) no gene *aveC* do cromossoma adicionando dois G's depois do C na posição nt 471 usando PCR, criando desse modo um sítio *BspE*1. A presença do sítio *BspE* submetido a engenharia foi útil para detectar o evento de substituição de gene. Os iniciadores PCR foram esboçados para introduzir uma mutação de frameshift (desvio) no gene *aveC*, e foram fornecidos por Genosys Biotechnologies, Inc. O iniciador para a direita foi: 5'-GGTTCCGGATGCCGTTCTCG-3' (SEQ ID NO:8) e o iniciador para a esquerda foi: 5'-AACTCCGGTCTGACTCCCCTTC-3' (SEQ ID NO:9). As condições PCR foram tal como foi descrito na Secção 7.1.10 acima referido. O produto PCR 666 bp foi digerido com *Sph*I para dar origem a dois fragmentos de 278 bp e 388 bp, respectivamente. O fragmento 388 bp foi purificado a partir do gel.

O plasmídeo de substituição de gene foi construído como se segue: vector de rearranjo pWHM3 foi digerido com *Eco*RI e *Bam*HI. PSE119 foi digerido com *Bam*HI e *Sph*I, o produto digerido foi submetido a electroforese, e um fragmento ~840 bp foi purificado a partir do gel. PSE119 foi digerido com *Eco*RI e *Xmn*I, o produto digerido foi separado por electroforese, e um fragmento ~1,7 Kb foi purificado a partir do gel. Os quatro fragmentos (isto é, ~7,2 Kb, ~840 bp, ~1,7 Kb, e 388 bp) foram ligados uns aos outros numa ligação de 4 vias. A mistura de ligação foi transformada em células competentes de *E. coli* DH5 $\alpha$ . O DNA do plasmídeo foi isolado a partir de transformantes resistentes a ampicilina e a presença do elemento inserido correcto foi confirmado por análise de restrição e análise de sequência de DNA. Este plasmídeo, que foi designado como pSE185, foi transformado em *E. coli* DM1 e DNA de plasmídeo isolado a partir de transformantes resistentes a ampicilina. Este plasmídeo foi usado para transformar protoplastos da estirpe *S. avermitilis* 1100-SC38. Agentes de transformação resistentes a tiostrepton da estirpe 1100-SC38 foram isolados e analisados por análise HPLC de produtos de fermentação. PSE185 não alterou de um modo significativo as proporções de avermectinas B2:B1 quando transformados em *S. avermitilis* da estirpe 1100-SC38 (QUADRO 2).

PSE185 foi usado para transformar protoplastos de *S. avermitilis* para dar origem a uma mutação de frameshift

(desvio) no gene *aveC* do cromossoma. Os protoplastos foram preparados a partir de transformantes resistentes a tiostrepton e foram colocados em placas sob a forma de colónias simples em RM14. Depois dos protoplastos se terem regenerado, colónias simples foram rastreadas quanto a ausencia de resistência a tiostrepton. O DNA do cromossoma a partir de colónias sensíveis a tiostrepton foi isolado e avliado por PCR quanto à presença da mutação de frameshift integrada no cromossoma. Os iniciadores PCR foram esboçados tendo como base a sequencia de nucleótidos *aveC*, e foram fornecidos por Genosys Biotechnologies, Inc. (Texas). O iniciador PCR para a direita foi: 5'-GCAAGGATACGGGGACTAC-3' (SEQ ID NO:10) e o iniciador PCR para a esquerda foi: 5'-GAACCGACCGCCTGATAC-3' (SEQ ID NO:11), e as condições PCR foram tal como foi descrito na Secção 7.1.10 acima referida. O produto PCR obtido foi 543 bp e, quando digerido com *Bsp*EI, três fragmentos de 368 bp, 96 bp, e 79 bp foram observados, indicando integração cromossomica do gene *aveC* inactivado e perda da replicação livre.

Análise de fermentação de mutantes de *S. avermitilis* contendo a mutação de frameshift (desvio) no gene *aveC* revelou que avermectinas normais deixaram de ser produzidas, e que que estes mutantes tinham o mesmo perfil HPLC de fermentação que estirpes SE180-11 e SE184-1-13. Um transformante *Tio*<sup>s</sup> foi identificado e designado como estirpe SE185-5a.

Adicionalmente, foi produzida uma mutação no gene *aveC* que modifique a posição nt 520 a partir de G a A, que dá origem a alteração do codão codificando um triptofano (W) na posição (W) 116 até um codão de terminação. Uma estirpe de *S. avermitilis* com esta mutação não produziu avermectinas normais e apresentava o mesmo perfil de fermentação que estirpes SE180-11, SE184-1-13, e SE185-5a.

Adicionalmente, foram produzidas mutações no gene *aveC* que alteram ambos: (i) posição nt 970 a partir de G a A, que modifica o aminoácido na posição 266 a partir de uma glicina (G) num aspartato (D), e (ii) posição nt 996 de T a C, que modifica o aminoácido na posição 275 da tirosina (Y) a histidina (H). Uma estirpe de *S. avermitilis* com estas mutações (G266D/Y275H) não produziu avermectinas normais e apresentava o mesmo perfil de fermentação que estirpes SE180-11, SE184-1-13, e SE185-5a.

As estirpes de mutante de inactivação de *aveC* de *S. avermetilis* SE180-11, SE184-1-13, SE185-5a, e outras aqui proporcionadas, proporcionam instrumentos de rastreio do impacto de outras mutações no gene *aveC*. PSE186, que contem uma cópia do tipo selvagem do gene *aveC*, foi transformado em *E. coli* DM1, e DNA do plasmídeo foi isolado a partir de transformantes resistentes a ampicilina. Este DNA de pSE186 foi usado para transformar protoplastos de *S. avermitilis* da estirpe SE180-11. Os transformantes resistentes a tiostrepton da estirpe SE180-11 foram isolados, a presença de resistência a eritromicina foi

determinada, e transformantes Arm' foram analisados por análise HPLC de produtos de fermentação. A presença do gene *aveC* funcional *in trans* foi capaz de restaurar a normal produção de avermectina para a estirpe SE180-11 (FIGURA 5B).

**Análise de Mutação No Gene *aveC* Que Altera Proporções Da Classe B2:B1**

Tal como foi acima descrito, *S. avermitilis* da estirpe SE180-11 contendo um gene *aveC* inactivo foi complementado por transformação com um plasmídeo contendo um gene *aveC* funcional (pSE186). A estirpe SE180-11 foi também utilizada como uma estirpe hospedeira para caracterizar outras mutações no gene *aveC*, tal como é descrito mais abaixo.

DNA cromossómico foi isolado a partir da estirpe 1100-SC38, e foi usado como um template (padrão) para amplificação PCR do gene *aveC*. O ORF 1,2 Kb foi isolado por amplificação PCR usando iniciadores designados tendo como base a sequência de nucleótidos *aveC*. O iniciador para a direita foi SEQ ID NO:6 e o iniciador para a esquerda foi SEQ ID NO:7 (ver Secção 7.1.0, acima referido). O PCR e condições de subclonagem foram tal como foi descrito na Secção 7.1.10. A análise da sequência de DNA do ORF 1,2 Kb revela uma mutação no gene *aveC* que modifica nt posição 337 de C a T, o que modifica o aminoácido na posição 55 de serina (S) para fenilalanina (F). O gene *aveC* contendo a

mutação S55F foi subclonada para pWHM3 para produzir um plasmídeo que foi designado como pSE187, e que foi usado para transformar protoplastos da estirpe *S. avermitilis* SE180-11. Agentes de transformação resistentes a tiostrepton da estirpe SE180-11 foram isolados, a presença de resistência de eritromicina foi determinada, e transformantes  $\text{Tio}^r \text{ Erm}^r$  foram analisados por análise HPLC de produtos de fermentação. A presença do gene *aveC* codificando uma modificação no resíduo de aminoácido 55 (S55F) foi capaz de restaurar a produção normal de avermectina da estirpe SE180-11 (FIGURA 5C); contudo, a proporção ciclo-hexil B2:ciclo-hexil B1 foi de cerca de 26:1, em comparação com a estirpe SE180-11 transformada com pSE186, que apresentava uma proporção de B2:B1 de cerca de 1,6:1 (QUADRO 3), indicando que a simples mutação (S55F) modula a quantidade de ciclo-hexil-B2 produzido em relação a ciclo-hexil-B1.

Foi identificada uma outra mutação no gene *aveC* que modifica nt posição 862 de G a A, que modifica o aminoácido na posição 230 de glicina (G) a aspartato (D). Uma estirpe de *S. avermitilis* tendo esta mutação (G230D) produz avermectinas numa proporção B2:B1 de cerca de 30:1.

#### **Mutações que Reduzem A proporção B2:B1**

Foram realizadas várias mutações que reduzem a quantidade de ciclo-hexil-B2 produzido em relação a ciclo-hexil-B1, como se segue.

Foi identificada uma mutação no gene *aveC* que modifica nt posição 588 a partir de G a A, que modifica o aminoácido na posição 139 de alanina (A) para treonina (T). O gene *aveC* contendo a mutação A139T foi subclonado para pWHM3 para produzir um plasmídeo que foi designado pSE188, e que foi usado para transformar protoplastos de *S. avermitilis* da estirpe SE180-11. Agentes de transformação resistentes a tiostrepton da estirpe SE180-11 foram isolados, a presença de resistência a eritromicina foi determinada, e transformantes *Tio<sup>r</sup> Erm<sup>r</sup>* foram analisados por análise HPLC de produtos de transformação. A presença do gene *aveC* submetido a mutação que codificou uma modificação no resíduo de aminoácido 139 (A139T) foi capaz de restaurar a produção de avermectina para estirpe SE180-11 (FIGURA 5D); contudo, a proporção B2:B1 foi de cerca de 0,94:1, indicando que esta mutação reduz a quantidade de ciclo-hexil-B2 produzido em relação a ciclo-hexil-B1. Este resultado foi inesperado porque resultados publicados, assim como os resultados de mutações acima descritas, apenas demonstraram ou inactivação do gene *aveC* ou produção aumentada da forma B2 de avermectina em relação à forma B1 (QUADRO 3).

Porque a mutação de A139T alterou as proporções B2:B1 na direcção B1 mais favorável, foi construída uma mutação que codificou uma treonina em vez de uma serina na posição de aminoácido na posição 138. Assim, pSE186 foi

digerido com *Eco*RI e foi clonado para pGEM3zf (Promega) que tinha sido digerido com *Eco*RI. Este plasmídeo, que foi designado como pSE186a, foi digerido com *Apa*I e *Kpn*I, os fragmentos de DNA foram separados num gel de agarose, e dois fragmentos de ~3,8 Kb e ~0,4 Kb foram purificados a partir do gal. O DNA inserido ~1,2 Kb de pSE186 foi usado como um template (padrão) PCR para introduzir uma modificação de base simples em nt posição 585. Os iniciadores PCR foram esboçados para introduzir uma mutação em nt posição 585, e foram fornecidos por Genosys Biotechnologies, Inc. (Texas). O iniciador PCR para a direita foi: 5'-GGGGCGGGCCCGGGTGCAGGCGGAAATGCCCTGGCGACG-3' (seq id no:12); e o iniciador PCR para a esquerda foi: 5'-GGAACCGACCGCCTGATACA-3' (SEQ ID NO:13). A reacção PCR foi realizada usando um estojo genómico GC Advantage (Clonetech Laboratories, Palo Alto, CA) em tampão proporcionado pelo fabricante na presença de 200  $\mu$ M dNTPs, 200 pmol de cada iniciador, 50 ng DNA template (padrão), 1,0 M GC-Melt e 1 unidade Klen Taq Polymerase Mix num volume final de 50  $\mu$ l. O perfil térmico do primeiro ciclo foi de 94° C durante 1 minuto; seguindo-se 25 ciclos de 94° C durante 30 segundos e 68° C durante 2 minutos; e 1 ciclo a 68° C durante 3 minutos. Um produto PCR de 295 bp foi digerido com *Apa*I e *Kpn*I para libertar um fragmento 254 bp, o qual foi separado por electrofores e foi purificado a partir do gel. Os três fragmentos (~3,8 Kb, ~0,4 Kb e 254 bp) foram ligados uns aos outros numa ligação de 3 vias. A mistura de ligação foi

transformada em células competentes de *E. coli* DH5 $\alpha$ . O DNA do plasmídeo foi isolado a partir de transformantes resistentes a ampicilina, e a presença do elemento inserido correcto foi confirmada por análise de restrição. O plasmídeo foi designado como pSE198.

PSE198 foi digerido com *Eco*RI, foi clonado para pWHM3, que tinha sido digerido com *Eco*RI, e transformado em células de *E. coli* DH5 $\alpha$ . O DNA de plasmídeo foi isolado a partir de transformantes resistentes a ampicilina e a presença do elemento de inserção correcto foi confirmada por análise de restrição e análise de sequência de DNA. Este DNA de plasmídeo foi transformado em *E. coli* DM1, DNA de plasmídeo foi isolado a partir de transformantes resistentes a ampicilina, e a presença do elemento de inserção correcto foi confirmada por análise de restrição. O plasmídeo, que foi designado como pSE199, foi usado para transformar protoplastos de *S. avermitilis* da estirpe SE180-11. Agentes de transformação resistentes a tiostrepton da estirpe SE180-11 foram isolados, a presença de resistência a eritromicina foi determinada, e transformantes *Tio*<sup>r</sup> *Erm*<sup>r</sup> foram analisados por análise HPLC de produtos de fermentação. A presença do gene *aveC* submetido a mutação codificando uma modificação no resíduo de aminoácido 138 (S138T) foi capaz de restaurar uma produção normal de avermectina para estirpe SE180:11; contudo, a proporção B2:B1 foi de 0,88:1 indicando que esta mutação reduz a quantidade de ciclo-hexil-B2 produzido em

relação a ciclo-hexil-B1 (QUADRO 3). Este proporção B2:B1 é ainda mais baixo do que a proporção 0,94:1 observado com a mutação A139T produzida por transformação da estirpe SE180-11 com pSE188, tal como foi acima descrito.

Foi construída outra mutação para introduzir uma treonina em ambas as posições de aminoácido 138 e 139. O DNA inserido ~1,2 Kb a partir de pSE186 foi usado como um template (padrão) PCR. Os iniciadores PCR foram esboçados para introduzir mutações em nt posições 585 e 588, e foram fornecidos por Genosys Biotechnologies, Inc. (Texas). O iniciador PCR para a direita foi: 5'-GGGGCGGGCCCGGGTGC GGAGGCGGAAATGCCGCTGGCGACGACC-3' (SEQ ID NO:14) ; e o iniciador PCR para a esquerda foi: 5'-GGAACATCACGGCATTCA CC-3' (SEQ ID NO:15). A reacção PCR foi realizada usando as condições imediatamente acima descritas nesta Secção. Um produto PCR de 449 bp foi digerido com *Apa*I e *Kpn*I para libertar um fragmento 254 bp, que foi separado por electroforese e foi purificado a partir do gel. PSE186a foi digerido com *Apa*I e *Kpn*I, os fragmentos de DNA foram separados em gel de agarose, e dois fragmentos de ~3,8 Kb e ~0,4 Kb foram purificados a partir do gel. Os três fragmentos (~3,8 Kb, ~0,4 Kb e 254 bp) foram ligados uns aos outros numa ligação de 3 vias, e a mistura de ligação foi transformada em células competentes de *E. coli* DH5 $\alpha$ . DNA de plasmídeo foi isolado a partir de transformantes resistentes a ampicilina, e a presença do elemento de inserção correcto foi confirmado por análise de restrição. Este plasmídeo foi designado como pSE230.

pSE230 foi digerido com *EcoRI*, foi clonado para pWHM3, que tinha sido digerido com *EcoRI*, e transformado em células *E. coli* DH5 $\alpha$ . DNA de plasmídeo foi isolado a partir de transformantes resistentes a ampicilina e a presença de elemento de inserção correcto foi confirmada por análise de restrição e análise da sequência de DNA. Este DNA de plasmídeo foi transformado em *E. coli* DMI, DNA de plasmídeo isolado a partir de transformantes resistentes a ampicilina, e a presença do elemento de inserção correcto foi confirmada por análise de restrição. Este plasmídeo, que foi designado como pSE231, foi usado para transformar protoplastos da estirpe de *S. avermitilis* SE180-11. Agentes de transformação resistentes a tiostrepton de SE180-11 foram isolados, a presença de resistência a eritromicina foi determinada, e os transformantes *Tio*<sup>r</sup> *Erm*<sup>r</sup> foram analisados por fermentação. A presença do gene *aveC* com dupla mutação codificando S138T/A139T, foi capaz de restaurar uma normal produção de avermectina para a estirpe SE180:11; contudo, a proporção B2:B1 foi de 0,84:1 revelando que esta mutação reduz ainda mais a quantidade de ciclo-hexil-B2 produzida em relação a ciclo-hexil-B1 (QUADRO 3), superior às reduções proporcionadas por transformação da estirpe SE180-11 com pSE188 ou pSE199, tal como foi acima descrito.

Outra mutação foi construída para reduzir ainda mais a quantidade de ciclo-hexil-B2 produzida em relação a ciclo-hexil-B1. Porque as mutações S138T/A139T alteraram as

proporções B2:B1 na direcção mais favorável de B1, foi construída uma mutação para introduzir uma treonina na posição do aminoácido 138 e uma fenilalanina na posição de aminoácido 139. O DNA de elemento de inserção ~1,2 Kb a partir de pSE186 foi usado como um template (padrão) PCR. Os iniciadores PCR foram esboçados para introduzir mutações em nt posições 585 (mudando um T em A), 588 (mudando um G em T), e 589 (mudando um C em T), e foram fornecidos por Genosys Biotechnologies, Inc. (Texas). O iniciador PCR para a direita foi: 5'-GGGGCGGGCCCGGGTGCGGAGGCGGAAATGCCGCT-GGCGACGTTTC-3' (SEQ ID NO:16); e o iniciador PCR para a esquerda foi: 5'-GGAACATCACGGCATTCAAC-3' (SEQ ID NO:15). A reacção PCR foi realizada usando um PCR genómico Advantage GC (Clonetech Laboratories, Palo Alto, CA) em tampão proporcionado pelo fabricante na presença de 200  $\mu$ M de dNTPs, 200 pmol de cada iniciador, 50 ng de DNA template (padrão), 1,1 mM de acetato de Mg, 1,0 M GC-Melt e 1 unidade de Tth DNA Polymerase num volume final de 50  $\mu$ l. O perfil térmico do primeiro ciclo foi de 94° C durante 1 minuto; seguiram-se 25 ciclos de 94° C durante 30 segundos e 68° C durante 2 minutos; e 1 ciclo a 68° C durante 3 minutos. Um produto PCR de 449 bp foi digerido com *Apa*I e *Kpn*I para libertar um fragmento 254 bp, o qual foi separado por electroforese e purificado a partir do gel. Os três fragmentos (~3,8 Kb, ~0,4 Kb e 254 bp) foram ligados uns aos outros numa ligação de 3 vias. A mistura de ligação foi transformada em células competentes de *E. coli* DH5 $\alpha$ . DNA do plasmídeo foi isolado a partir de transformantes resistentes a ampicilina, e a presença do elemento de

inserção correcto foi confirmada por análise de restrição. Este plasmídeo foi designado como pSE238.

pSE238 foi digerido com *EcoRI*, foi clonado para pWHM3, que tinha sido digerido com *EcoRI*, e transformado em células de *E. coli* DH5 $\alpha$ . DNA de plasmídeo foi isolado a partir de transformantes resistentes a ampicilina e a presença do elemento de inserção correcto foi confirmada por análise de restrição e análise de sequência de DNA. Este DNA de plasmídeo foi transformado em *E. coli* DM1, DNA de plasmídeo isolado a partir de transformantes resistentes a ampicilina, e a presença do elemento de inserção correcto foi confirmada por análise de restrição. Este plasmídeo, que foi designado como pSE231, foi usado para transformar protoplastos da estirpe de *S. avermitilis* SE180-11. Agentes de transformação resistentes a tiostrepton de SE180-11 foram isolados, a presença de resistência a eritromicina foi determinada, e os transformantes *Tio*<sup>r</sup> *Erm*<sup>r</sup> foram analisados por análise HPLC de produtos de fermentação. A presença do gene *aveC* com dupla mutação codificando S138T/A139F, foi capaz de restaurar uma normal produção de avermectina para a estirpe SE180:11; contudo, a proporção B2:B1 foi de 0,75:1 revelando que esta mutação reduz ainda mais a quantidade de ciclo-hexil-B2 produzida em relação a ciclo-hexil-B1 (QUADRO 3), superior às reduções proporcionadas por transformação da estirpe SE180-11 com pSE188, pSE199, ou pSE231, tal como foi acima descrito.

QUADRO 3

Estirpe <i>S. avermitilis</i> (transformando plasmídeo)	No. de Transformantes Testados	Conc. B2 Relativa	Conc. B1 Relativa	Proporção Média B2;B1
SE180-11 (nenhum)	30	0	0	0
SE180-11 (pWHM3)	30	0	0	0
SE180-11 (pSE186)	26	222	140	1,59
SE180-11 (pSE187)	12	283	11	26,3
SE180-11 (pSE188)	24	193	206	0,94
SE180-11 (pSE199)	18	155	171	0,88
SE180-11 (pSE231)	6	259	309	0,84
SE180-11 (pSE239)	20	184	242	0,75

Mutações adicionais foram construídas para reduzir ainda mais a quantidade de ciclo-hexil-B2 produzida em relação a ciclo-hexil-B1 usando a técnica de rearranjo de DNA tal como foi descrito por Stemmer, 1994, Nature 370:389-391; e Stemmer, 1994, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 91:10747-10751; e descrita ainda nas Patentes dos E.U.A. Nos. 5.605.793; 5.811.238; 5.830.721; e 5.837.458.

Plasmídeos com arrastamento de DNA contendo genes *aveC* submetidos a mutação foram transformados em células competentes *dam dcm* *E. coli*. DNA de plasmídeo foi isolado a partir de transformantes resistentes à ampicilina, e foi usado para transformar protoplastos de *S. avermitilis* da estirpe SE180-11. Agentes de transformação resistentes a tiostrepton da estirpe SE-180-11 foram isolados e rastreados quanto à produção de avermectinas com uma proporção de ciclo-hexil-B2:ciclo-hexil B1 de 1:1 ou inferior. Foi determinada a sequência de DNA de plasmídeo a

partir de transformantes SE180-11 produzindo avermectinas com uma proporção B2:B1 de 1:1 ou inferior.

Foram identificados oito transformantes que produziram quantidades reduzidas de ciclo-hexil-B2 em relação a ciclo-hexil-B1. A proporção B2:B1 mais baixo conseguido entre estes transformantes foi de 0,40:1 (QUADRO 4). O DNA de plasmídeo foi isolado para cada um dos oito transformantes e a sequência de DNA foi determinada para identificar as mutações no gene *avec*. As mutações são como se segue.

PSE290 contém 4 mutações de nucleótido em nt posição 317 de T a A, em nt posição 353 de C a A, em nt posição 438 de G a A, e em nt posição 1155 de T a A. A modificação do nucleótido em nt posição 317 modifica o aminoácido em AA posição 48 de D a E e a modificação do nucleótido em nt posição 438 modifica o aminoácido na posição 89 de AA de A a T. A proporção B2:B1 produzido por células que transportam este plasmídeo foi de 0,42:1 (QUADRO 4).

PSE291 contém 4 mutações de nucleótidos em nt posição 272 de G a A, em nt posição 585 de T a A, em nt posição 588 de G a A, e em nt posição 708 de G a A. A modificação do nucleótido em nt posição 585 modifica o aminoácido na posição 138 de AA de S a T, a modificação do nucleótido em nt posição 588 modifica o aminoácido na posição 139 de AA de A a T, e a modificação do nucleótido em nt posição 708 modifica o aminoácido na posição 170 de

AA de G a S. A proporção B2:B1 produzido por células transportando este plasmídeo foi de 0,57:1 (QUADRO 4).

PSE292 contém as mesmas quatro mutações de nucleótido que pSE290. A proporção B2:B1 produzido por células transportando este plasmídeo foi de 0,40:1 (QUADRO 4).

PSE293 contém 6 mutações de nucleótido em nt de A a G, em nt posição 286 de A a C, em nt posição 497 de T a C, em nt posição 554 de C a T, em nt posição 580 de T a C, e em nt posição 886 de A a T. A modificação de nucleótido em nt posição 286 modifica o aminoácido na posição 38 de AA de Q a P, a modificação do nucleótido em nt posição 580 modifica o aminoácido na posição 136 de AA de L a P, e a modificação de nucleótido em nt posição 886 modifica o aminoácido na posição 238 de AA de E a D. A proporção B2:B1 produzido por células transportando o plasmídeo foi de 0,68:1 (QUADRO 4).

PSE294 contém 6 mutações de nucleótido em nt 469 de T a C, em nt posição 585 de T a A, em nt posição 588 de G a A, em nt posição 708 de G a A, em nt posição 708 de G a A, em nt posição 833 de C a T, em nt posição 1184 de G a A. Além disso, nts em posições 173, 174, e 175 são deletadas. A modificação de nucleótido em nt posição 469 modifica o aminoácido na posição 99 de AA de F a S, a modificação de nucleótido em nt posição 585 modifica o aminoácido na posição 138 de AA de S a T, a modificação de nucleótido em nt posição 588 modifica o aminoácido na posição 139 de AA

de A a T, e a modificação de nucleótido em nt posição 708 modifica o aminoácido na posição 179 de AA de G a S. A proporção B2:B1 produzido por células transportando este plasmídeo foi de 0,53:1 (QUADRO 4).

PSE2295 contém 2 mutações de nucleótidos em nt 588 de G a A e em nt 856 de T a C. A modificação do nucleótido em nt posição 588 modifica o aminoácido na posição 139 de AA de A a T e a modificação do nucleótido em nt posição 856 modifica o aminoácido na posição 228 de AA de M a T. A proporção B2:B1 produzido por células transportando este plasmídeo foi de 0,80:1 (QUADRO 4).

PSE296 contém 5 mutações de nucleótidos em nt posição 155 de T a C, em nt posição 505 de G a T, em nt posição 1039 de C a T, em nt posição 1202 de C a T, e em nt posição 1210 de T a C. A modificação de nucleótido em nt posição 505 modifica o aminoácido na posição 111 de AA de G a V e a modificação do nucleótido em nt posição 1039 modifica o aminoácido na posição 289 de AA de P a L. A proporção B2:B1 produzido por células transportando este plasmídeo foi de 0,73:1 (QUADRO 4).

PSE297 contém 4 mutações de nucleótido em nt posição 377 de G a T, em nt posição 588 de G a A, em nt posição 633 de A a G, e em nt posição 1067 de A a T. A modificação do nucleótido em nt posição 588 modifica o aminoácido na posição 139 de AA de A a T, a modificação do nucleótido em nt posição 633 modifica o aminoácido na posição 154 de AA de K a E, e a modificação do nucleótido

em nt posição 1067 modifica o aminoácido na posição 298 de AA de Q a H. A proporção B2:B1 produzido por células transportando este plasmídeo foi de 0,67:1 (QUADRO 4).

QUADRO 4

Estirpe <i>S. avermitilis</i> (transformando plasmídeo)	No. de Transformantes Testados	Conc. Relativa B2	Conc. Relativa B1	Proporção B2:B1 Média
SE180-11 (nenhum)	4	0	0	0
SE180-11 (pWHM3)	4	0	0	0
SE180-11 (pSE290)	4	87	208	0,42
SE180-11 (pSE291)	4	106	185	0,57
SE180-11 (pSE292)	4	91	231	0,40
SE180-11 (pSE293)	4	123	180	0,68
SE180-11 (pSE294)	4	68	129	0,53
SE180-11 (pSE295)	4	217	271	0,80
SE180-11 (pSE296)	1	134	186	0,73
SE180-11 (pSE297)	1	148	221	0,67

Uma sucessão adicional de rearranjo de DNA foi conduzida para reduzir ainda mais a quantidade de avermectina ciclo-hexil-B2 produzida em relação a avermectina ciclo-hexil-B1 como se segue.

Rearranjo semi-sintético

O melhor clone foi rearranjado usando o método descrito em PCT International Publication WO 97/20078 por Maxygen Inc. Oligonucleótidos individuais codificando substituições benéficas correspondendo melhor a uma proporção B2:B1 diminuído foram adicionados à reacção de rearranjo com um excesso molar de 5 sobre aos cordões

template (padrão) aveC. Cada nucleótido mal combinado do oligonucleótido foi flanqueado por 20 nucleótidos de identidade perfeita para assegurar uma incorporação apropriada ao longo da reacção de rearranjo. Os oligonucleótidos foram adquiridos a partir de Operon Technologies (Alameda, CA).

Crescimento HTP de *S. avermitilis*

Clones independentes foram colhidos a partir das placas de transformação e foram inoculados em 200 µl de meio R5 (Kieser, T., et al., "Practical Streptomyces Genetics", 2000, Norwich, U.K., John Innes Foundation) em placas para semear com 96 cavidades e foram feitos crescer a 30° C com agitação. A cada cavidade, foi fornecida uma pérola de vidro para dispersão de micélios e agitação da cultura.

Durante este período de tempo, as culturas atingiram um crescimento uniforme e denso. Após 4-5 dias, foram fornecidos às placas de produção 20 µl de meio de cultura para sementeira e o volume que permaneceu foi congelado como placas dominantes a -80° C depois da adição de glicerol à concentração final de 20%. As placas de produção foram incubadas a 30° sob humidade durante 12-14 dias. A esporulação das estirpes ocorreu após 5-8 dias de incubação. As placas de produção foram produzidas essencialmente tal como é descrito em PCT International Publication WO 99/41389 por Pfizer Inc., com a excepção de adição de 1% de agarose para assegurar uma superfície sólida.

Extracção e rastreio de ESI-MS/MS

Um total de 1 ml de acetato de etilo foi adicionado a cada cavidade e foi incubado com agitação à temperatura ambiente durante 20 minutos. Aproximadamente 750  $\mu$ l do acetato de etilo-fase foram recuperados, transferidos para uma placa com 96 cavidades e regulados para evaporação durante a noite. O precipitado foi suspenso de novo em 100  $\mu$ l de metanol 1 mM NaCl dos quais 5  $\mu$ l de solução foram injectados em espectrometro de massa por um aparelho automático de amostras num formato de 96 cavidades e analisado directamente na fase de injecção de fluxo sem cromatografia líquida ou outra separação. Os compostos foram ionizados por ionização por electropulverização e dois canais separados foram monitorizados em duas transições MS/MS. A transição MS/MS para ião sodiado B1 varia entre m/z 921 e m/z 777 e para ião sodiado B2 varia entre m/z 939 e m/z 795 em modo positivo. Um espectrómetro de massa Finnigan TSQ-7000, Micromass Quattro-LC e um aparelho automático para amostras Leap TechnologY Twin-Pal foram usados para este rastreio de elevada produtividade. Integração dos cromatogramas separados B1 e B2 para cada localização de cavidade identificou os pontos mais elevados.

Foram identificadas cinquenta e sete (57) novas combinações de substituições de aminoácido que podem produzir proporções de avermectinas ciclo-hexil B2:ciclo-hexil B1 de 0,35:1 ou inferiores (FIGURA 6). Várias destas novas mutações podem produzir proporções de avermectinas ciclo-hexil B2:ciclo-hexil B1 de cerca de 0,30:1 ou

inferiores; vários podem produzir proporções de avermectinas ciclo-hexil B2:ciclo-hexil B1 de cerca de 0,25:1 ou inferiores, e várias podem produzir proporções de avermectinas ciclo-hexil B2:ciclo-hexil B1 de cerca de 0,20:1 ou inferiores. Foram identificadas duas (2) novas mutações que produzem proporções de avermectinas ciclo-hexil B2:ciclo-hexil B1 de 0,37 ou 0,38.

**DEPÓSITO DE MATERIAIS BIOLÓGICOS**

Os plasmídeos que se seguem foram depositados com a American Type Culture Collection (ATCC) aem12301 Parklawn Drive, Rockville, MD, 20852, USA, em 29 de Janeiro de 1998, e foram-lhes atribuídos os seguintes números de acesso:

Plasmídeo	No. de Acesso
Plasmídeo pSE 180	209605
Plasmídeo pSE 186	209604

O endereço corrente da American Type Culture Collection é 10801 University Blvd, Manassas, VA, 20110, USA.

O presente invento não deverá ser limitado no seu âmbito pela forma de realização específica aqui descrita, que pretende constituir uma simples ilustração de aspectos individuais do invento. Na verdade, várias modificações do invento, para além das aqui apresentadas e descritas tornar-se-ão aparentes para os especialistas nesta técnica a partir da descrição anterior e desenhos acompanhantes. Essas modificações pretendem situar-se no âmbito das reivindicações apensas.

**PE1476539**

- 130 -

Lisboa, 2 de Abril de 2009

## LISTAGEM DE SEQUÊNCIAS

<110> PFIZER PRODUCTS INC.

<120> STREPTOMYCES AVERMILITIS GENE DIRECTING THE RATIO OF B2:B1 AYERMECTINS

<130> PC23034A

<140> PC23034A

<141> 2002-02-12

<160> 16

<170> PatentIn Ver. 2.1

2102-1

4211-1229

<212> DNA

<213> *Streptomyces avermitilis*

4220

2212 GDS

5222 (174), 110853

<400> 1

tcggccctggcc ccaccaaaat ttatcttggaca cccgcggccatc ccgtatggccaaat ctcttcscgggg 120

aggccggcgtt gaacagggtca 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 373  
 Val Phe Ser Arg Trp Ala Ala Asp Gly Gly Tyr Arg Leu Ile Glu Thr  
 30 35 40

gcg ggc cag ggt cag ggc ggc agc aag gat acg ggg act acc gat gtg 320  
 Ala Gly Gln Gln Gly Ser Lys Asp Thr Gly Thr Thr Asp Val  
 35 10 45

gtc tat ecc gtg att tcc gtc gtc tgc atc acc gcc gcc gcg gcg gcg tgg 368  
 Val Tyr Pro Val Ile Ser Val Val Cys Ile Thr Ala Ala Ala Ala Trp

50	55	60	65	
ctc ttc cgg agg tgc cgt gtc gaa cga cgg ctg ctg ttc gac gcc ctt				416
Leu Phe Arg Arg Cys Arg Val Glu Arg Arg Leu Leu Phe Asp Ala Leu				
70	75	80		
ctc ttc ctc ggg ctg ctg ttc gcg agc tgg cag agc ccc 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		
ggg tcc tgg ggt ccc tat gtc ccc ggc tgg cag ggg gcg ggc ccc 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 ccc ctg gcg tcc gtc tcc atg tcc tcc 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 gtc ctg tcc 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		
ccg cgg ccg gca tgg cgg acc tgg cgg ctg gtc ctg gcc gtc 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 gtc ctc ggt ctg tcc gag ccc ctg ccc 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 gtc 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 gtc 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 tcc ctg ccc ttc ttc ccc gac gaa ccc gat gag				896
Cys Cys Met Leu Gly Ser Leu Arg Phe Phe Arg Asp Glu Arg Asp Glu				
230	235	240		
tcg tgg gtc gaa cgg gga gcc tgg cgg ttg ccc caa cgg gca gcg aac				944
Ser Trp Val Glu Arg Gly Ala Trp Arg Leu Pro Gln Arg Ala Ala Asn				



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	

&lt;210&gt; 3

&lt;211&gt; 1150

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Streptomyces hygroscopicus

&lt;220&gt;

&lt;221&gt; CDS

&lt;222&gt; (58)..(990)

&lt;400&gt; 3

gtcgacgaag accggccggg ggcgcgtcgcc cggggccgata cccgtacgcgg cctgcgg	57
-------------------------------------------------------------------	----

gtg ttc acc ctt ccc gta aca ctg tgg gcg tgg 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 tgg gag	201		
Tyr Arg Ile Glu Lys Ala Ser Pro Ala Arg Gly Gly Asp Ser Glu			
35	40	45	

cggtt atc gcc gat gtg 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 tcc ttc atc ggg ctg ctg tgg 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 cgg 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 tcc tgg ggg ccc 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 gcs cac cag gag gcc gag ctg ccc 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 gca ggg gtg gcc tcc ggc aag ggc atg	537
Ile Cys Met Thr Ala Met Ala Ala Val Ala Cys Gly Lys Gly Met	
145 150 155 160	
ggt ctt gcc gcc gcc cgg tgg cgg cgg ctg ggg ccc ctc cgg ctg atc	585
Gly Leu Ala Ala Ala Arg Trp Pro Arg Leu Gly Pro Leu Arg Leu Ile	
165 170 175	
gca ctc ggc ttt ctg ctc gtc gtg ctc ctc gac atc gcc gag ccc 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 ccc ctg tat cag atg gtg	729
Thr Ile Trp Ser Gly His Trp Tyr Gln Phe Pro Leu Tyr Gln Met Val	
210 215 220	
gtt tcg gcg ctc ttc ggc gcc tct ttg ggg gcc gcg ccc 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 gca 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 tgg ctg atg gac ggc gat ccc ccc 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 gaccggccgc accacccacg tacccatgt 1020  
 Arg Pro Ala Ala Gly Tyr  
 305 310

gccccatgtg cctgatgcgc ctgatgtaco cgggggtgtca tcggctcacc tgtggcgct 1080  
 catgcggtgaa gcgcctccgcct tagtcattgt tcgggttcct gggctccacg accatacgga 1140  
 ggggggggggg 1150

&lt;210&gt; 4

&lt;211&gt; 310

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Streptomyces hygroscopicus

&lt;400&gt; 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 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		

&lt;210&gt; 5

&lt;211&gt; 215

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Streptomyces griseochromogenes

&lt;400&gt; 5

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

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

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

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

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

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

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

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

Gly Ala Trp Tyr Arg Ala Arg  
 210 215

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

<400> 6  
 tcacgaaacc ggacacac 18

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

<400> 7  
 ctagatcgct gaaaccgag 18

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

<400> 8  
 gggtccggat ggccgttcgg 20

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

<400> 9  
aactccggtc gaccccccctt c 21  
  
<210> 10  
<211> 19  
<212> DNA  
<213> Streptomyces avermitilis  
  
<400> 10  
gcaaggatcac ggggaciac 19  
  
<210> 11  
<211> 18  
<212> DNA  
<213> Streptomyces avermitilis  
  
<400> 11  
gaaccgacccg ccgtatac 16  
  
<210> 12  
<211> 43  
<212> DNA  
<213> Streptomyces avermitilis  
  
<400> 12  
ggggggggggc ccgggtgggg aggccggaaat gccccgggg acg 43  
  
<210> 13  
<211> 20  
<212> DNA  
<213> Streptomyces avermitilis  
  
<400> 13  
ggaaccgacc gcctgtatca 20  
  
<210> 14  
<211> 46  
<212> DNA  
<213> Streptomyces avermitilis  
  
<400> 14  
ggggggggggc ccgggtgggg aggccggaaat gccgtgggg acgacc 46  
  
<210> 15  
<211> 20  
<212> DNA  
<213> Streptomyces avermitilis  
  
<400> 15  
ggaacatcac ggcaatcac 20  
  
<210> 16  
<211> 46  
<212> DNA  
<213> Streptomyces avermitilis  
  
<400> 16  
ggggggggggc ccgggtgggg aggccggaaat gccgtgggg acgttc 46

**PE1476539**

- 140 -

## REIVINDICAÇÕES

1. Uma molécula de polinucleótido compreendendo uma sequência de nucleótidos que é por outro lado a mesma que a do alelo *aveC* de *Streptomyces avermitilis*, a sequência que codifica o produto gene *AveC* de *S. avermitilis* de plasmídeo pSE186 (ATCC 209604) da sequência de nucleótidos do *aveC* ORF de *S. avermitilis* tal como apresentados na FIGURA 1 (SEQ ID NO:1), ou uma sua variante degenerada, mas cuja sequência de nucleótidos compreende ainda mutações codificando uma combinação de substituições de aminoácido nos resíduos de aminoácido correspondendo às posições de aminoácido de SEQ ID NO:2, de modo a que células de *S. avermitilis* estirpe ATCC 53692 em que o alelo *aveC* do tipo selvagem foi inactivado e que expressam a molécula de polinucleótido compreendendo a sequência de nucleótidos submetidos a mutação são capazes de produzir uma proporção da classe 2:1 de avermectinas que é reduzido em comparação com a proporção produzido por células de *S. avermitilis* da estirpe ATCC 53692 que pelo contrário expressa apenas alelo *aveC* do tipo selvagem, em que quando as avermectinas da classe 2:1 são avermectinas ciclo-hexil B2:ciclo-hexil B1 a proporção das avermectinas da classe 2:1 é 0,2:1 ou inferior, e em que as combinações de substituições de aminoácido compreendem substituições tanto em D48 como em G179, e em que a combinação de substituições de aminoácido compreende uma combinação seleccionada de entre o grupo consistindo em:

- (da) S41G, D48E, A61T, R71L, A89T, L136M, S138T, A139T, T149S, G179S, V196A, E238D, F278L, P289L;
- (db) S41G, D48E, A61T, R71L, A89T, L136M, S138T, A139T, T149S, F176C, G179S, V196A, E238D, P289L;
- (dc) D48E, R71L, A89T, L136P, T149S, F176C, G179S, E238D, I280V;
- (dd) D48E, A61T, R71L, W110L, T149S, G179S, V196A, L206M, E238D, V271A, I280V;
- (de) D48E, A61T, R71L, A89T, L136M, S138T, A139T, T149S, G179S, V196A, E238D, H279Q, P289L;
- (df) D48E, A61T, R71L, A89T, L136M, S138T, A139T, T149S, G179S, V196A, E238D, G287E, P289Q;
- (dg) D48E, A61T, R71L, A89T, L136M, S138T, A139T, T149S, G179S, V196A, E238D, P289L;
- (dh) D48E, A61T, R71L, A89T, A139T, T149S, F176C, G179S, V196A, E238D, V285G, P289L;
- (di) Q38R, D48E, A61T, R71L, L87V, A89T, L136M, S138T, A139T, T149S, G179S, V196A, E238D, P289L;
- (dj) D48E, A61T, L87V, A89T, W110L, S138T, A139T, T149S, G179S, V196A, E238D, P289L;
- (dk) D48E, A61T, R71L, A89T, L136M, S138T, A139T, T149S, G179S, V196A, E238S, P289L;
- (dl) D48E, A89T, L136P, K154E, G179S, S231L, E238D;
- (ea) D48E, A61T, R71L, A89T, L136P, T149S, F176C, G179S, V196A, E238D, I280V;
- (eb) D48E, R71L, A89T, L136P, T149S, F176C, G179S, E238D, I280V;

- (ec) Q36P, D48E, A61T, R71L, A89T, L136P, T149S, F176C, G179S, V196A, E238D, I280V;
- (ed) D48E, A61T, R71L, A89T, A139T, T149S, F176C, G179S, V196A, E238D, I280V;
- (ee) V2M, D48E, A61T, R71L, A89T, L136P, T149S, F176C, G179S, V196A, E238D, I280V;
- (ef) D48E, A61T, R71L, A89T, L136P, T149S, F176C, G179S, V196A, E238D, I280V, A302T;
- (eg) D48E, R71L, A89T, L136P, T149S, F176C, G179S E238D, P289L;
- (eh) D48E, R71L, A89T, L136P, T149S, F176C, G179S, E238D, A302T;
- (ei) D48E, R71L, A89T, L136P, T149S, F176C, G179S, V196A, E238D, I280V;
- (ej) D48E, A61T, R71L, A89T, L136P, T149S, F176C, G179S, V196A, E238D;
- (ek) V2M, D48E, R71L, A89T, L136P, T149S, F176C, G179S, V196A, E238D, I280V;
- (el) D48E, A61T, R71L, A89T, L136P, T149S, R162H, F176C, G179S, V196A, E238D, I280V;
- (em) D48E, R71L, A89T, V120A, L136P, T149S, K154E, G179S, S231L, E238D;
- (en) D48E, R71L, A89T, V120A, L136P, T149S, F176C, G179S, S231L, E238D, I280V;
- (eo) D48E, A61T, R71L, L87V, A89T, S90N, A139T, T149S, F176C, G179S, V196A, E238D, V285G, P289L;
- (ep) D48E, A61T, R71L, L87V, A89T, A139T, T149S, F176C, G179S, V196A, E238D, V285G, P289L;

- (eq) D48E, R71L, A89T, L136P, K154E, G179S, S231L, E238D;
- (er) D48E, R71L, A89T, V120A, L136P, K154E, F176C, G179S, S231L, E238D; e
- (es) D48E, R71L, A89T, V120A, L136P, T149S, K154E, F176C, G179S, S231L, E238D.

2. A molécula de polinucleótido da reivindicação 1, em que a combinação de substituições de aminoácidos é:

- (ea) D48E, A61T, R71L, A89T, L136P, T149S, F176C, G179S, V196A, E238D, I280V.

3. Um vector recombinante compreendendo a molécula de polinucleótido da reivindicação 1 ou 2.

4. Uma célula hospedeira compreendendo o vector recombinante da reivindicação 3, **com a condição da referida célula hospedeira não ser um organismo humano.**

5. A célula hospedeira da reivindicação 4, que é uma célula de *Streptomyces*.

6. A célula hospedeira da reivindicação 5, que é uma célula de *Streptomyces avermitilis*.

7. Um método para produzir uma estirpe de *Streptomyces avermitilis*, compreendendo (i) mutação do

alelo *aveC* numa célula da estirpe de *S. avermitilis*, cuja mutação dá origem a uma combinação de substituições de aminoácido no produto gene AveC ou (ii) introdução numa célula de uma estirpe de *S. avermitilis* de um alelo *aveC* submetido a mutação ou uma sua variante degenerada codificando um produto gene AveC compreendendo uma combinação de substituições de aminoácido, em que as células submetidas a mutação compreendendo o alelo *aveC* submetido a mutação ou uma sua variante degenerada são capazes de produzir avermectinas ciclo-hexil B2:ciclo-hexil B1 numa proporção de 0,2:1 ou inferior, e em que as combinações de substituições de aminoácido compreendem substituições tanto em D48 como em G179, em que a combinação de substituições de aminoácido no produto gene AveC compreende uma combinação seleccionada de entre o grupo consistindo em:

- (da) S41G, D48E, A61T, R71L, A89T, L136M, S138T, A139T, T149S, G179S, V196A, E238D, F278L, P289L;
- (db) S41G, D48E, A61T, R71L, A89T, L136M, S138T, A139T, T149S, F176C, G179S, V196A, E238D, P289L;
- (dc) D48E, R71L, A89T, L136P, T149S, F176C, G179S, E238D, I280V;
- (dd) D48E, A61T, R71L, W110L, T149S, G179S, V196A, L206M, E238D, V271A, I280V;
- (de) D48E, A61T, R71L, A89T, L136M, S138T, A139T, T149S, G179S, V196A, E238D, H279Q, P289L;
- (df) D48E, A61T, R71L, A89T, L136M, S138T, A139T, T149S, G179S, V196A, E238D, G287E, P289Q;

- (dg) D48E, A61T, R71L, A89T, L136M, S138T, A139T, T149S, G179S, V196A, E238D, P289L;
- (dh) D48E, A61T, R71L, A89T, A139T, T149S, F176C, G179S, V196A, E238D, V285G, P289L;
- (di) Q38R, D48E, A61T, R71L, L87V, A89T, L136M, S138T, A139T, T149S, G179S, V196A, E238D, P289L;
- (dj) D48E, A61T, L87V, A89T, W110L, S138T, A139T, T149S, G179S, V196A, E238D, P289L;
- (dk) D48E, A61T, R71L, A89T, L136M, S138T, A139T, T149S, G179S, V196A, E238S, P289L;
- (dl) D48E, A89T, L136P, K154E, G179S, S231L, E238D;
- (ea) D48E, A61T, R71L, A89T, L136P, T149S, F176C, G179S, V196A, E238D, I280V;
- (eb) D48E, R71L, A89T, L136P, T149S, F176C, G179S, E238D, I280V;
- (ec) Q36P, D48E, A61T, R71L, A89T, L136P, T149S, F176C, G179S, V196A, E238D, I280V;
- (ed) D48E, A61T, R71L, A89T, A139T, T149S, F176C, G179S, V196A, E238D, I280V;
- (ee) V2M, D48E, A61T, R71L, A89T, L136P, T149S, F176C, G179S, V196A, E238D, I280V;
- (ef) D48E, A61T, R71L, A89T, L136P, T149S, F176C, G179S, V196A, E238D, I280V, A302T;
- (eg) D48E, R71L, A89T, L136P, T149S, F176C, G179S E238D, P289L;
- (eh) D48E, R71L, A89T, L136P, T149S, F176C, G179S, E238D, A302T;
- (ei) D48E, R71L, A89T, L136P, T149S, F176C, G179S, V196A, E238D, I280V;

- (ej) D48E, A61T, R71L, A89T, L136P, T149S, F176C, G179S, V196A, E238D;
- (ek) V2M, D48E, R71L, A89T, L136P, T149S, F176C, G179S, V196A, E238D, I280V;
- (el) D48E, A61T, R71L, A89T, L136P, T149S, R162H, F176C, G179S, V196A, E238D, I280V;
- (em) D48E, R71L, A89T, V120A, L136P, T149S, K154E, G179S, S231L, E238D;
- (en) D48E, R71L, A89T, V120A, L136P, T149S, F176C, G179S, S231L, E238D, I280V;
- (eo) D48E, A61T, R71L, L87V, A89T, S90N, A139T, T149S, F176C, G179S, V196A, E238D, V285G, P289L;
- (ep) D48E, A61T, R71L, L87V, A89T, A139T, T149S, F176C, G179S, V196A, E238D, V285G, P289L;
- (eq) D48E, R71L, A89T, L136P, K154E, G179S, S231L, E238D;
- (er) D48E, R71L, A89T, V120A, L136P, K154E, F176C, G179S, S231L, E238D; e
- (es) D48E, R71L, A89T, V120A, L136P, T149S, K154E, F176C, G179S, S231L, E238D.

8. Uma célula de uma espécie de *Streptomyces* que comprehende um alelo *aveC* de *S. avermitilis* submetido a mutação ou uma sua variante degenerada codificando um produto gene AveC comprehendendo uma combinação de substituições de aminoácido seleccionada de entre o grupo consistindo em:

- (da) S41G, D48E, A61T, R71L, A89T, L136M, S138T, A139T, T149S, G179S, V196A, E238D, F278L, P289L;
- (db) S41G, D48E, A61T, R71L, A89T, L136M, S138T, A139T, T149S, F176C, G179S, V196A, E238D, P289L;
- (dc) D48E, R71L, A89T, L136P, T149S, F176C, G179S, E238D, I280V;
- (dd) D48E, A61T, R71L, W110L, T149S, G179S, V196A, L206M, E238D, V271A, I280V;
- (de) D48E, A61T, R71L, A89T, L136M, S138T, A139T, T149S, G179S, V196A, E238D, H279Q, P289L;
- (df) D48E, A61T, R71L, A89T, L136M, S138T, A139T, T149S, G179S, V196A, E238D, G287E, P289Q;
- (dg) D48E, A61T, R71L, A89T, L136M, S138T, A139T, T149S, G179S, V196A, E238D, P289L;
- (dh) D48E, A61T, R71L, A89T, A139T, T149S, F176C, G179S, V196A, E238D, V285G, P289L;
- (di) Q38R, D48E, A61T, R71L, L87V, A89T, L136M, S138T, A139T, T149S, G179S, V196A, E238D, P289L;
- (dj) D48E, A61T, L87V, A89T, W110L, S138T, A139T, T149S, G179S, V196A, E238D, P289L;
- (dk) D48E, A61T, R71L, A89T, L136M, S138T, A139T, T149S, G179S, V196A, E238S, P289L;
- (dl) D48E, A89T, L136P, K154E, G179S, S231L, E238D;
- (ea) D48E, A61T, R71L, A89T, L136P, T149S, F176C, G179S, V196A, E238D, I280V;
- (eb) D48E, R71L, A89T, L136P, T149S, F176C, G179S, E238D, I280V;
- (ec) Q36P, D48E, A61T, R71L, A89T, L136P, T149S, F176C, G179S, V196A, E238D, I280V;

- (ed) D48E, A61T, R71L, A89T, A139T, T149S, F176C, G179S, V196A, E238D, I280V;
- (ee) V2M, D48E, A61T, R71L, A89T, L136P, T149S, F176C, G179S, V196A, E238D, I280V;
- (ef) D48E, A61T, R71L, A89T, L136P, T149S, F176C, G179S, V196A, E238D, I280V, A302T;
- (eg) D48E, R71L, A89T, L136P, T149S, F176C, G179S E238D, P289L;
- (eh) D48E, R71L, A89T, L136P, T149S, F176C, G179S, E238D, A302T;
- (ei) D48E, R71L, A89T, L136P, T149S, F176C, G179S, V196A, E238D, I280V;
- (ej) D48E, A61T, R71L, A89T, L136P, T149S, F176C, G179S, V196A, E238D;
- (ek) V2M, D48E, R71L, A89T, L136P, T149S, F176C, G179S, V196A, E238D, I280V;
- (el) D48E, A61T, R71L, A89T, L136P, T149S, R162H, F176C, G179S, V196A, E238D, I280V;
- (em) D48E, R71L, A89T, V120A, L136P, T149S, K154E, G179S, S231L, E238D;
- (en) D48E, R71L, A89T, V120A, L136P, T149S, F176C, G179S, S231L, E238D, I280V;
- (eo) D48E, A61T, R71L, L87V, A89T, S90N, A139T, T149S, F176C, G179S, V196A, E238D, V285G, P289L;
- (ep) D48E, A61T, R71L, L87V, A89T, A139T, T149S, F176C, G179S, V196A, E238D, V285G, P289L;
- (eq) D48E, R71L, A89T, L136P, K154E, G179S, S231L, E238D;

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

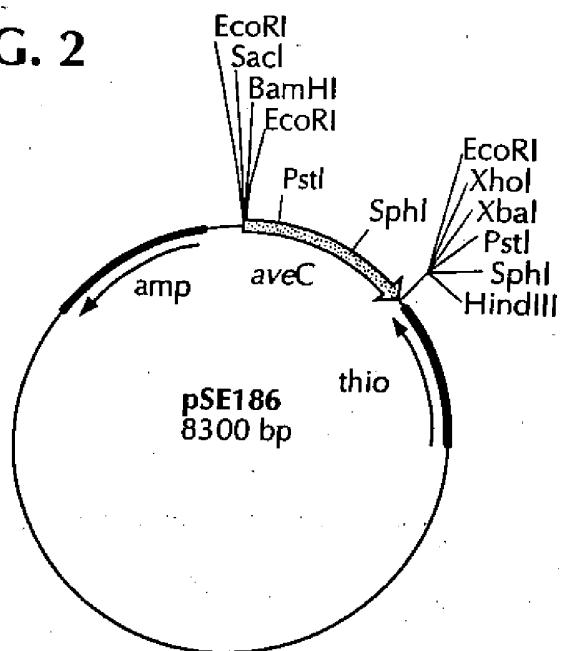
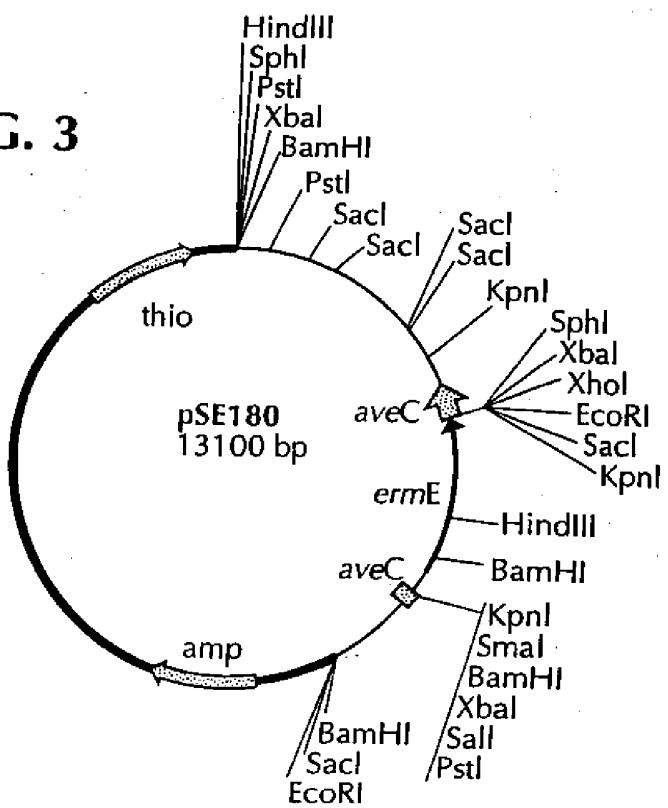
(es) D48E, R71L, A89T, V120A, L136P, T149S, K154E,  
F176C, G179S, S231L, E238D.

9. A célula da reivindicação 8, que é uma célula de *Streptomyces avermitilis*.

10. Um processo para a produção de avermectinas, compreendendo a cultura de uma estirpe das células de *Streptomyces avermitilis* da reivindicação 8, num meio de cultura sob condições que permitem ou induzem a produção de avermectinas a partir daí, e recuperação das referidas avermectinas a partir da cultura.

Lisboa, 2 de Abril de 2009

15

**FIG. 2****FIG. 3**

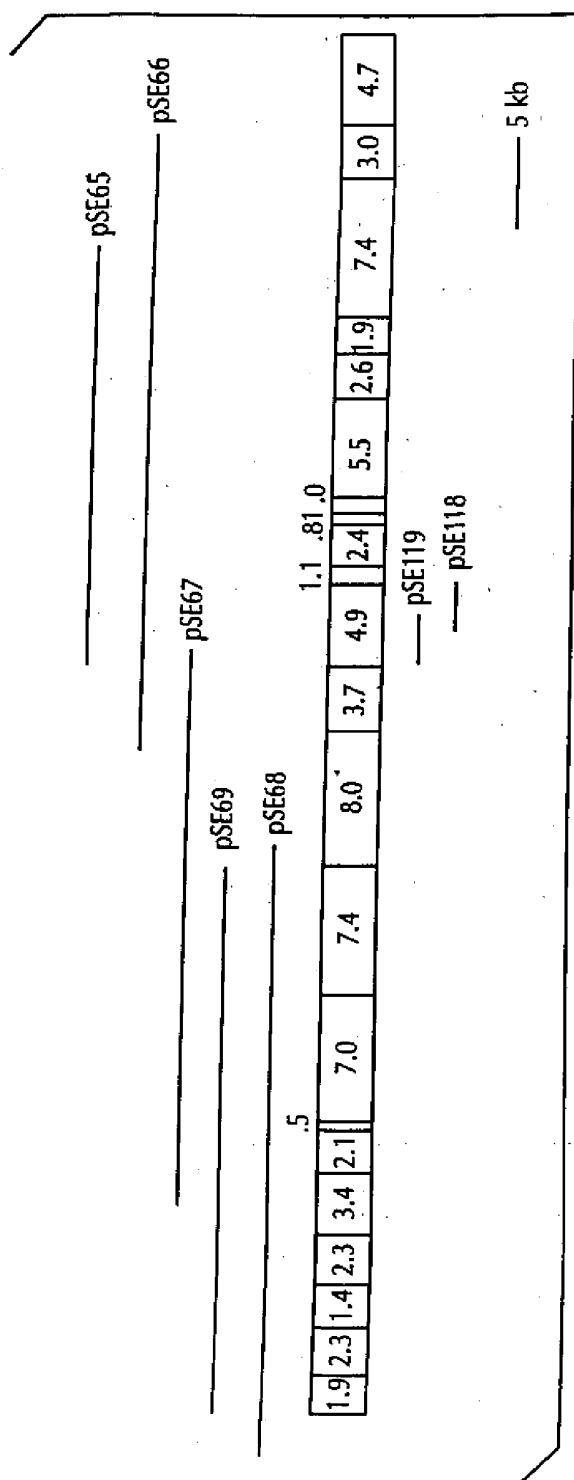
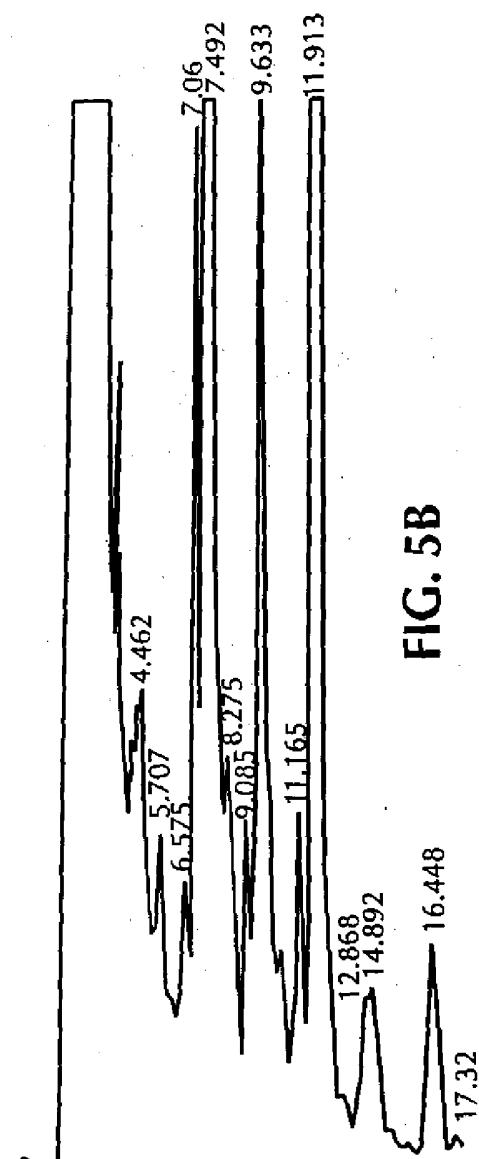
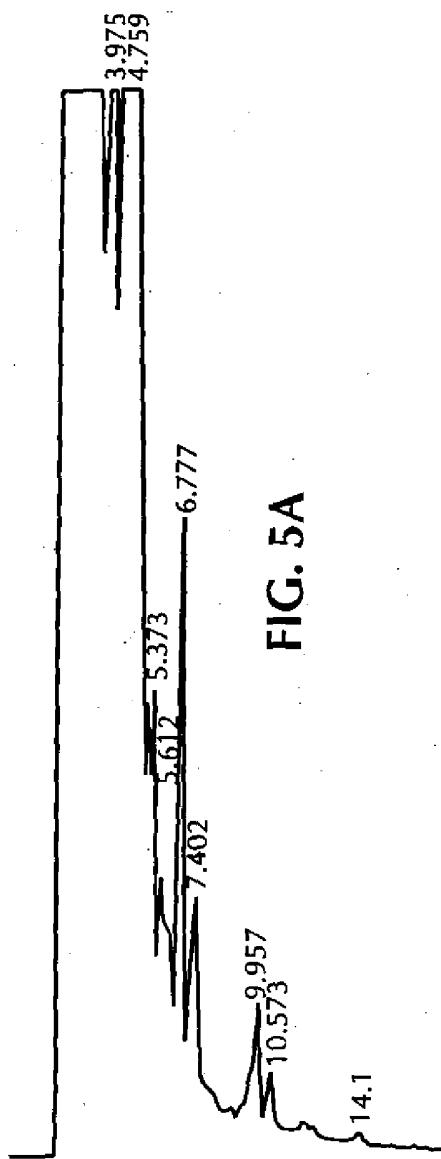
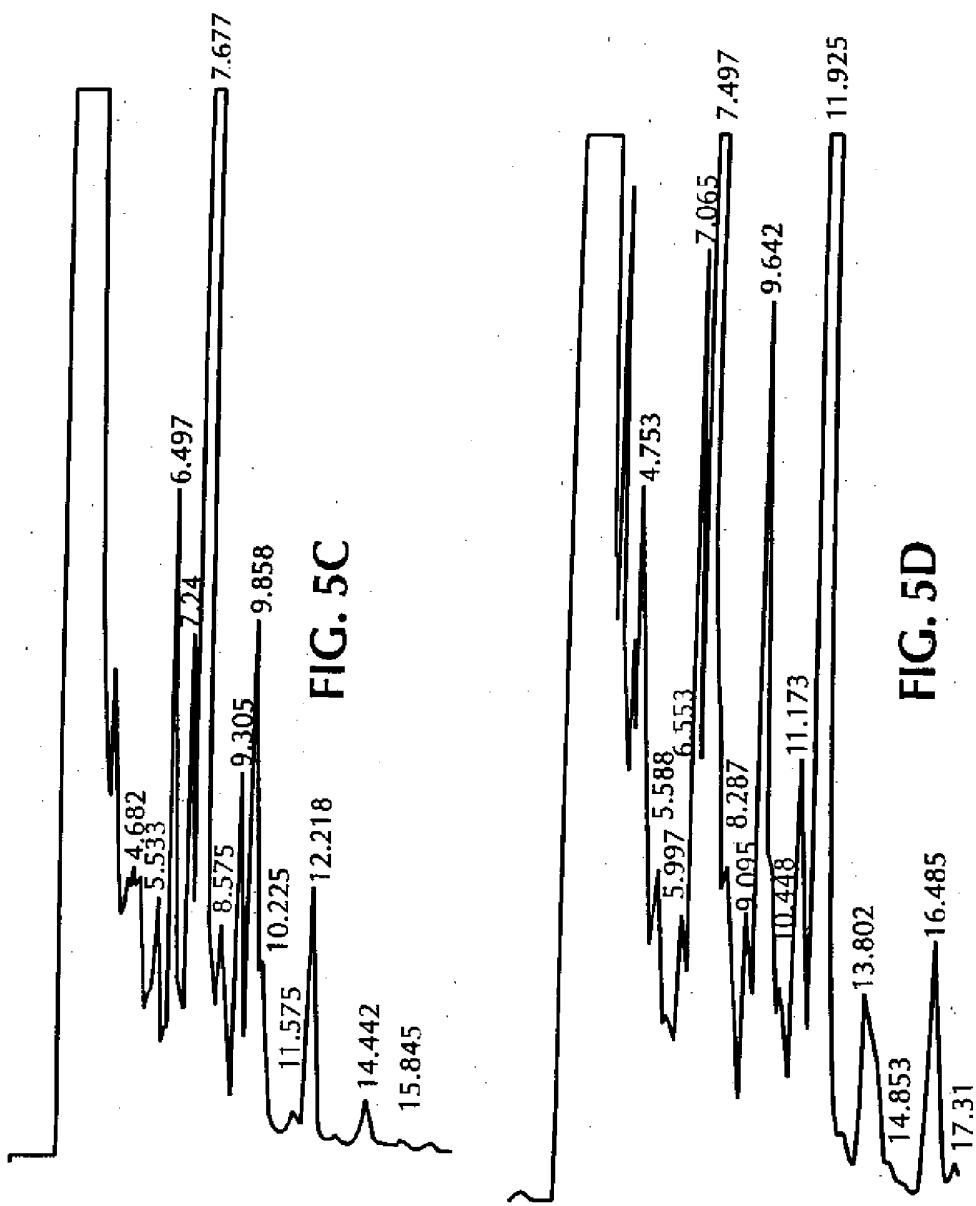


FIG. 4





**Figura 6A**

Plasmídeo	Mutações	[B2]	[B1]	B2:B1
pSE501	D48E, L136P, G179S, E238D (A132G), T317A, T580C, G708A, A887T, (A1124G)	52	184	0,28
pSE502	D48E, A89T, L136P, G179S, E238D T317A, G438A, T580A, G708A, A887T	42	204	0,20
pSE503	D48E, A89T, L136P, K154E, G179S, E238D T317A, G438A, (T497C), T580C, T633C, G708A, (C775T), A887T	32	172	0,19
pSE504	D25G, D48E, A89T, L136P, S138T, A139T, V141A, I159T, R163Q, G179S A247G, T317A, G438A, (T497C), T580C, T585A, G588A, T595C, T649C, G661A	44	205	0,21
pSE505	D48E, A89T, S138T, A139T, K154R, G179S, V196A, P289L T317A, G438A, T585A, G588A, A634G, G708A, T760C, A761C, C1039T	35	178	0,20
pSE506	D48E, A89T, S138T, A139F, G179S, V196A, E238D T317A, G438A, (T497C), T585A, G588T, G589T, G708A, T760C, A716C, A887C	26	135	0,19
pSE507	D48E, A61T, A89T, L136P, G179S, V196A, A198G, P289L T317A, G354A, G438A, (T497C), T580C, G708A, T760C, A761C, C766G, C11039T	18	88	0,20

**Figura 6B**

Plasmídeo	Mutações	[B2]	[B1]	B2/B1
PSE508	D48E, A89T, S90G, L136P, R163Q, G179S, E238D	22	91	0,24
	T317A, G438A, A441G, T580C, G661A, G708A, A887T, (A938G)			
PSE509	D48E, A61T, S138T, A139F, G179S, G196A, E238D, P289L  (G136A), T317A, G354A, (T497C), T585A, G588T, C589T, G708A, T760C, A761C, A887C, C1039T	22	114	0,19
	T317A, G354A, (T497C), T580C, G798A, A887C			
PSE510	D48E, A61T, L136P, G179S, E238D	64	211	0,30
	T317A, G354A, (T497C), T580C, G798A, A887C			
PSE511	D48E, A61T, A89T, G111V, S138T, A139T, G179S, E238D, P289L	20	91	0,21
	T317A, G354A, (T416C), G438A, G505T, T585A, G588A, G708A, (G775T), A887C, C1039T			
PSE512	D48E, A61T, L136P, G179S,	55	88	0,29
	T317A, G354A, (T497C), T580C, G708A			
PSE514	D48E, A89T, L136P, G179S,	36	175	0,20
	(T33A), T317A, G438A, (T497C), T580C, G708A			
PSE515	D48E, A89T, V120A, L136P, G179S	36	189	0,19
	T317A, G438A, T532C, T580C, G708A, (T1031C)			

**Figura 6C**

Plasmídeo	Mutações	[B2]	[B1]	B2/B1
PSE517	D48E, A61T, A89T, S138T, A139F, G179S, V196A, A198G, E238D	20	99	0,20
	T317A, G354A, G438A, (T497C), T585A, G588T, C589T, G708A, T760C, A761C, C766G, A887C			
pSE518	D48E, A61T, A89T, G111V, S138T, A139F, G179S, V196A, E238D	11	57	0,18
	T317A, G354A, G438A, G505T, T585A, G588T, C589T, G708A, T760C, A761C, A887C			
pSE519	D48E, A89T, S138T, A139T, G179S	40	153	0,26
	T317A, G438A, T585A, G588A, G708A			
pSE520	D48E, A89T, S138T, A139T, G179S	45	177	0,25
	T317A, G438A, (T497C), T585C, G588A, G708A			
pSE523	D48E, L136P, R163Q, G179S, S231L	37	168	0,22
	T317A, T580C, G661A, G708A, (T797C), C865T			
pSE524	D48E, A89T, L136P, G179S, E238D	25	137	0,18
	T317A, G438A, (T497C), T580C, G708A, A887T			
pSE525	D48E, A89T, L136P, G179S	22	129	0,17
	T317A, G438A, (T497C), T580C, G708A			

**Figura 6D**

Plasmídeo	Mutações	[B2]	[B1]	B2/B1
PSE526	D48E, A61T, L136P, G179S, A198G, P202S, E238D, P289L, T317A, G354A, (T497C), T580C, G708A, C766G, C777T, A887C, C1039T	35	135	0,26
pSE527	D48E, L136P, S138T, A139F, G179S, V196A, E238D, T317A, (T497C), T580C, T585A, G588T, C589T, G708A, T760C, A761C, A887C	31	119	0,25
PSE528	D48E, A61T, L136P, S138T, A139F, G179S, E238D, T317A, G354A, (T497C), T580C, T585A, G588T, C589T, G708A, A887C, C1039T	50	160	0,30
pSE529	D48E, A61T, A89T, S138T, A139T, G179S, V196A, E238D, P289L, T317A, G354A, G438A, (T497C), T585A, G588A, G708A, T760C, A761C, A887C, C1039T	26	150	0,17
pSE530	D48E, L136P, G179S, A198G, E238D, P289L, (C97T), T317A, T580C, G708A, C766G, A887C, C1039T	37	136	0,27
pSE531	D48E, A61T, S138T, A139F, G179S, A198G, P289L, T317A, G354A, (T497C), T585A, G588T, C589T, G708A, C766G, C1039T	27	101	0,27

**Figura 6E**

Plasmídeo	Mutações	[B2]	[B1]	B2/B1
pSE532	D48E, A61T, A89T, L136P, S138T, A139F, G179S, A198G, E238D	19	91	0,20
	T317A, G354A, G438A, (T497C), T580C, T585A, G588T, C589T, G708A, C766G, A887C			
pSE534	D48E, L84P, G111V, S138T, A139T, G179S, A198G, P289L	37	139	0,26
	T317A, T424C, G505T, T585A, G588A, G708A, C766G, C1039T			
pSE535	Y28C, D48E, A61T, A89T, S138T, A139T, G179S, E238D	34	132	0,26
	A256G, T317A, G354A, G438A, T585A, G588A, G708A, A887C			
pSE536	D48E, A89T, S138T, A139F, G179S, A198G, V220A	19	106	0,17
	(G137T), T317A, G438A, (T497C), T585A, G588T, C589T, G708A, C766G, T832C			
pSE537	D48E, A61T, A89T, S138T, A139T, G179S, V196A, E238D, R239H, P289L	34	171	0,19
	T317A, G354A, G438A, (T497C), T585A, G588A, G708A, T760C, A761C, A887C, G889A, C1039T			
pSE538	D48E, A61T, A89T, S138T, A139T, G179S, A198G, P289L	13	39	0,33
	T317A, G354A, G438A, T585A, G588A, G708A, C766G, C1039T			
pSE539	D48E, A61T, A89T, F99S, S138T, A139T, G179S, E238D	43	179	0,24
	T317A, G354A, G438A, G469C, (T\$)/C, T585A, G588A, G708A, A887C, (C1094T)			

**Figura 6F**

Plasmídeo	Mutações	[B2]	[B1]	B2/B1
PSE540	G35S, D48E, A89T, S138T, A139T, G179S, P289L, G276A, T317A, G438A, (T497C), T585A, G588A, G708A, C1039T	42	180	0,23
pSE541	D48E, A61T, A89T, L136P, G179S, P289L (C266T), T317A, G354A, G438A, (T497C), T580C, G708A, C1039T	36	174	0,20
PSE542	D48E, A61T, A107T, S108G, L136P, G179S, S192A, E238D, P289L T317A, G354A, G492A, A495G, (T497C), T580C, G708A, T747G, A887C, C1039T	50	175	0,29
pSE543	D48E, A61T, A89T, G111V, S138T, A139F, G179S, E238D, P289L T317A, G354A, G438A, G505T, T585A, G588T, C589T, G708A, A887C, C1039T	17	67	0,25
pSE545	D48E, L136P, G179S, R250W G317A, T580C, G708A, C921T	37	134	0,27
pSE546	D48E, L136P, G179S, E238D G317A, T580C, G708A, A887T	48	178	0,27
pSE547	D48E, A61T, A89T, S138T, A139T, G179S, V196A, E238D T317A, G354A, G438A, T585A, G588A, G708A, T760C, A761C, A887C	32	142	0,23

**PE1476539****12/18****Figura 6G**

<b>Plasmídeo</b>	<b>Mutações</b>	<b>[B2]</b>	<b>[B1]</b>	<b>B2/B1</b>
pSE548	D48E, A89T, S138T, A139T, R163Q, G179S (T114C), (T130C), T317A, G438A, T585A, G588A, G661A, G708A	41	157	0,26
pSE549	D48E, A89T, S138T, A139T, G179S, V196A, E238D, P289L G317A, G438A, (T497C), T585A, G588A, G708A, T760C, A761C, A887C, C1039T	24	141	0,17
pSE550	D48E, A89T, G111V, S138T, A139T, G179S, A198G, E238D T317A, G438A, G505T, T585A, G588A, G708A, C766G, A887C	19	76	0,25
pSE551	D48E, A61T, A89T, S138T, A139F, G179S, V196A, E238D T317A, G354A, G438A, (T494C), T585A, G588T, C589T, G708A, T760C, A761C, A887C	24	141	0,17
pSE552	D48E, L136P, G179S, A198G, P289L T317A, (T497C), T580C, G708A, C766G, C1039T	40	154	0,26
pSE553	D48E, A89T, S138T, A139T, G179S, V196A, E238D, P289L T317A, G438A, (T497C), T585A, G588A, G708A, T760C, A761C, A887C, C1039T	23	123	0,18
pSE554	D48E, A61T, A89T, S138T, A139T, G179S, V196A, E238D, O289L T317A, G354A, G438A, (T497C), T585A, G588A, G708A, T760C, A761C, A887C, C1039T	30	162	0,18

**PE1476539****13/18****Figura 6H**

<b>Plasmídeo</b>	<b>Mutações</b>	<b>[B2]</b>	<b>[B1]</b>	<b>B2/B1</b>
pSE556	D48E, S138T, A139T, G179S, E238D	66	177	0,37
	(T169C), T317A, T585A, G588A, G708A, A887T			
pSE557	D48E, F78L, A89T, L136P, G179S	57	219	0,26
	A317A, T405C, G438A, T580C, G708A			
pSE558	S41G, D48E, A89T, L136P, G179S	51	215	0,24
	(G87A), A294G, T317A, G438A, T580C, G708A			
pSE559	G40S, D48E, L136P, G179S, E238D	81	247	0,33
	G291A, T317A, T580C, G708A, A887T			
pSE561	Y28C, Q38R, D48E, L136P, G179S, E238D	31	83	0,37
	A256G, A286G, T317A, (T497C), T580C, G708A, A887T			
pSE563	D48E, A89T, L136P, R163Q, G179S, P252S	43	177	0,24
	T317A, G438A, T580C, G661A, G708A, C927T			
pSE564	D48E, A89T, S138T, A139T, G179S, E238D, F278L	61	216	0,28
	T317A, G438A, (T497C), T585A, G588A, G708A, A887T, T1005C			
pSE565	D48E, A89T, S138T, A139T, G179S, E238D, F278L	59	210	0,28
	T317A, G438A, (T497C), T585A, G588A, G708A, A887T, T1005C			

**Figura 6I**

Plasmídeo	Mutações	[B2]	[B1]	B2/B1
PSE566	D48E, A89T, L136P, G179S, F234S	37	154	0,24
	T317A, (C341T), G438A, (T497C), T580C, (C695T), G708A, T874C			
PSE567	D48E, L136P, R163Q, G179S,	60	192	0,31
	T317A, T580C, G661A, G708A			
PSE568	D48E, A89T, L136P, R163Q, G179S	48	173	0,28
	(T85C), T317A, G438A, (T497C), T580C, G661A, G708A, (C800T)			
PSE569	D48E, S138T, A139T, G179S, E238D	59	153	0,38
	(T104C), T317A, (T497C), T585A, G588A, G708A, A887T			
PSE570	D48E, L136P, R163Q, G179S, E238D	73	221	0,33
	T317A, T580C, G661A, G708A, A887T			
PSE571	D48E, L136P, R163Q, G179S, A200G, E238D	75	236	0,32
	(T67C), T317A, T580C, G661A, G708A, C772G, A887T			
PSE572	D48E, L136P, R163Q, G179S, E238D	74	229	0,32
	T317A, (T497C), T580C, G661A, G708A, A887T			
PSE573	D48E, A89T, L136P, R163Q, G179S, E238D	39	173	0,23
	T317A, G438A, T580C, G661A, G708A, A887T			

**Figura 6J**

Plasmídeo	Mutações	[B2]	[B1]	B2/B1
PSE574	Q36R, D48E, A89T, L136P, G179S, E238D	53	231	0,23
	A280G, T317A, (G359A), G438A, T580C, G708A, (T836C), A887T			
PSE575	D48E, A89T, L136P, R163Q, G179S	49	217	0,23
	T317A, G438A, T580C, G661A, (C704T), G708A, (G965A)			
PSE576	D48E, A89T, L136P, R163Q, G179S	44	197	0,22
	T317A, G438A, T580C, G661A, G708A			
PSE577	D48E, A89T, S138T, G179S,	36	140	0,25
	T317A, G438A, (T497C), T585A, G708A			
PSE578	D48E, A89T, L136P, P163Q, G179S, E238D	45	193	0,23
	T317A, G438A, (T497C), T580C, G661A, G708A, A887T			

**Figura 6K**

<b>Plasmídeo</b>	<b>Mutações</b>	<b>[B2]</b>	<b>[B1]</b>	<b>B2/B1</b>
pSE582 ca	V3L, L136M	186	178	1,04
pSE583 cb	G26A, D48Y, R75W, S93N	94	88	1,07
pSE584 cc	R71L	314	293	1,07
pSE585 cd	T47I, W110L, A139T	168	189	0,89
pSE586 ce	V104I, S138T, V220I, F234I	150	138	1,10
pSE587 cf	G45R, A64V, R69K	182	192	0,95
pSE588 cg	S90N	251	243	1,03
pSE589 ch	G26D, W110L, R233H	97	107	0,91
pSE590 ci	Q36R, V104I, P128S, C152W, T276A	194	171	1,13
pSE591 cj	S90N	164	147	1,12
pSE592 ck	C142Y, A302T	152	133	1,14
pSE593 cl	V2M, V56D	117	121	0,97
pSE594 cm	S41G, L87V, A139T, L206M, G209R, 1280V	122	212	0,58
pSE595 cn	A62V, A139D	150	122	1,23
pSE596 co	F176C	203	204	1,0
pSE597 cp	T149S	120	135	0,89
pSE598 cq	A64T, C142Y	105	90	1,17
pSE599 cr	A130V, C142Y, L224M, E238V, L293M	79	71	1,11
pSE600 cs	A16T, K154M, L206F	103	97	1,06

**PE1476539**

**17/18**

**Figura 6L**

<b>Plasmídeo</b>	<b>Mutações</b>	<b>[B2]</b>	<b>[B1]</b>	<b>B2/B1</b>
pSE601 da	S41G, D48E, A61T, R71L, A89T, L136M, S138T, A139T, T149S, G179S, V196A, E238D, F278L, P289L	17	137	0,12
pSE602 db	S41G, D48E, A61T, R71L, A89T, L136M, S138T, A139T, T149S, F176C, G179S, V196A, E238D, P289L	17	87	0,19
pSE603 dc	D48E, R71L, A89T, L136P, T149S, F176C, G179S, E238D, I280V	19	146	0,13
pSE604 dd	D48E, A61T, R71L, W110L, T149S, G179S, V196A, L206M, E238D, V271A, I280V	26	180	0,14
pSE605 de	D48E, A61T, R71L, A89T, L136M, S138T, A139T, T149S, G179S, V196A, E238D, H279Q, P289L	22	158	0,14
pSE606 df	D48E, A61T, R71L, A89T, L136M, S138T, A139T, T149S, G179S, V196A, E238D, G287E, P289Q	16	94	0,17
pSE607 dg	D48E, A61T, R71L, A89T, L136M, S138T, A139T, T149S, G179S, V196A, E238D, P289L	21	243	0,13
pSE608 dh	D48E, A61T, R71L, A89T, A139T, T149S, F176C, G179S, V196A, E238D, V285G, P289L	18	146	0,12
pSE609 di	Q38R, D48E, A61T, R71L, L87V, A89T, L136M, S138T, A139T, T149S, G179S, V196A, E238D, P289L	20	150	0,13
pSE610 dj	D48E, A61T, L87V, A89T, W110L, S138T, A139T, T149S, G179S, V196A, E238D, P289L	14	110	0,13
pSE611 dk	D48E, A61T, R71L, A89T, L136M, S138T, A139T, T149S, G179S, V196A, E238S, P289L	25	184	0,14
pSE612 dl	D48E, A89T, L136P, K154E, G179S, S231L, E238D	16	132	0,12

**Figura 6M**

<b>Plasmídeo</b>	<b>Mutações</b>	<b>[B2]</b>	<b>[B1]</b>	<b>B2/B1</b>
pSE617 ea	D48E, A61T, R71L, A89T, L136P, T149S, F176C, G179S, V196A, E238D, I280V	4	86	0,05
pSE620 eb	D48E, R71L, A89T, L136P, T149S, F176C, G179S, E238D, I280V	17	179	0,08
pSE621 ec	Q36P, D48E, A61T, R71L, A89T, L136P, T149S, F176C, G179S, V196A, E238D, I280V	12	204	0,06
pSE622 ed	D48E, A61T, R71L, A89T, A139T, T149S, F176C, G179S, V196A, E238D, I280V	16	226	0,07
pSE639 ee	V2M, D48E, A61T, R71L, A89T, L136P, T149S, F176C, G179S, V196A, E238D, I280V	15	225	0,07
pSE643 ef	D48E, A61T, R71L, A89T, L136P, T149S, F176C, G179S, V196A, E238D, I280V, A302T	19	247	0,08
pSE646 eg	D48E, R71L, A89T, L136P, T149S, F176C, G179S E238D, P289L	7	100	0,06
pSE655 eh	D48E, R71L, A89T, L136P, T149S, F176C, G179S, E238D, A302T	10	139	0,07
pSE657 ei	D48E, R71L, A89T, L136P, T149S, F176C, G179S, V196A, E238D, I280V	9	157	0,06
pSE659 ej	D48E, A61T, R71L, A89T, L136P, T149S, F176C, G179S, V196A, E238D	7	105	0,06
pSE670 ek	V2M, D48E, R71L, A89T, L136P, T149S, F176C, G179S, V196A, E238D, I280V	7	104	0,07
pSE682 el	D48E, A61T, R71L, A89T, L136P, T149S, R162H, F176C, G179S, V196A, E238D, I280V	4	83	0,05
pSE683 em	D48E, R71L, A89T, V120A, L136P, T149S, K154E, G179S, S231L, E238D	8	154	0,05
pSE684 en	D48E, R71L, A89T, V120A, L136P, T149S, F176C, G179S, S231L, E238D, I280V	11	155	0,07
pSE685 eo	D48E, A61T, R71L, L87V, A89T, S90N, A139T, T149S, F176C, G179S, V196A, E238D, V285G, P289L	11	134	0,08
pSE686 ep	D48E, A61T, R71L, L87V, A89T, A139T, T149S, F176C, G179S, V196A, E238D, V285G, P289L	8	100	0,08
pSE579 eq	D48E, R71L, A89T, L136P, K154E, G179S, S231L, E238D	16	178	0,09
pSE580 er	D48E, R71L, A89T, V120A, L136P, K154E, F176C, G179S, S231L, E238D	14	149	0,09
pSE581 es	D48E, R71L, A89T, V120A, L136P, T149S, K154E, F176C, G179S, S231L, E238D	8	146	0,06