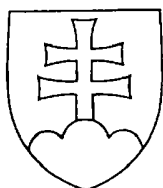


SLOVENSKÁ REPUBLIKA

(19) SK



ÚRAD
PRIEMYSELNÉHO
VLASTNÍCTVA
SLOVENSKEJ REPUBLIKY

ZVEREJNENÁ PATENTOVÁ PRIHLÁŠKA

- (22) Dátum podania prihlášky: 19. 7. 2000
(31) Číslo prioritnej prihlášky: 09/372 934
(32) Dátum podania prioritnej prihlášky: 12. 8. 1999
(33) Krajina alebo regionálna organizácia priority: US
(40) Dátum zverejnenia prihlášky: 6. 11. 2002
Vestník ÚPV SR č.: 11/2002
(62) Číslo pôvodnej prihlášky
v prípade vylúčenej prihlášky:
(86) Číslo podania medzinárodnej prihlášky
podľa PCT: PCT/IB00/00996
(87) Číslo zverejnenia medzinárodnej prihlášky
podľa PCT: WO01/12822

(11), (21) Číslo dokumentu:

138-2002

(13) Druh dokumentu: A3

(51) Int. Cl.⁷:

C12N 15/60,
C12N 9/88,
C12N 15/76,
C12N 1/21,
C12P 17/18,
C12P 19/62

(71) Prihlasovateľ: PFIZER PRODUCTS INC., Groton, CT, US;

(72) Pôvodca: Stutzman-Engwall Kim Jonelle, Groton, CT, US;

(74) Zástupca: Bušová Eva, JUDr., Bratislava, SK;

(54) Názov: Gén zo *Streptomyces avermitilis* riadiaci pomer B2 : B1 avermektínov

(57) Anotácia:

Sú opísané polynukleotidové sekvencie kódujúce produkt génu aveC, tieto polynukleotidové sekvencie môžu byť použité na ovplyvnenie pomeru alebo množstva 2 : 1 avermektínov produkovaných vo fermentačných kultúrach *S. avermitilis*. Tiež sú opísané vektory, hostiteľské bunky a zmutované kmene *S. avermitilis*, v ktorých bol gén aveC inaktívovaný alebo mutovaný tak, že došlo k zmene vytváraného pomeru alebo množstva triedy 2 : 1 avermektínov.

**Gén zo *Streptomyces avermitilis* riadiaci pomer B2:B1
avermektínov**

1. Oblasť techniky

Predkladaný vynález sa týka preparátov a spôsobov prípravy avermektínov primárne v odbore zdravia živočíchov. Konkrétnejšie sa predkladaný vynález týka polynukleotídových molekúl obsahujúcich nukleotídové sekvencie kódujúce produkt génu *aveC*, ktorý môže byť použitý na moduláciu pomeru triedy 2:1 avermektínov produkovaných fermentáciou kultúr *S. avermitilis*, a preparátov a spôsobov vyhľadávania takých polynukleotídových molekúl. Predkladaný vynález sa ďalej týka vektorov, transformovaných hostiteľských buniek a nových mutovaných kmeňov *S. avermitilis*, v ktorých bol gén *aveC* inaktivovaný alebo mutovaný tak, že došlo na moduláciu vytváraného pomeru alebo množstva triedy 2:1 avermektínov.

2. Doterajší stav techniky

2.1. Avermektíny

Streptomycety produkujú celý rad sekundárnych metabolitov vrátane avermektínov, ktoré zahŕňajú sériu ôsmich príbuzných šestnásťčlenných makrocyclických laktónov majúcich silnú antihelmintickú a insekticidálnu aktivitu. Osem odlišných a blízko príbuzných zlúčenín je označovaných ako A1a, A1b, A2a, A2b, B1a, B1b, B2a a B2b. Séria "a" zlúčenín sa týka prirodzeného avermektínu, kde substituentom v pozícii C25 je (S)-sec-butyl, a "b" séria zlúčenín sa týka tých zlúčenín, kde substituentom v C5 pozícii je izopropyl. Označenie "A" a "B" sa týka avermektínov, kde substituent v C5 pozícii je metoxy, respektíve hydroxy skupina. Číslo "1" sa týka avermektínov,

kde dvojná väzba je prítomná v pozícii C22,23 a číslo "2" sa týka avermektínov majúcich vodík v pozícii C22 a hydroxy skupinu v pozícii C23. Medzi príbuznými avermektínmi je typ B1 avermektínu rozpoznávaný ako avermektín majúci najúčinnnejšiu antiparazitickú a pesticídovú aktivitu a je preto komerčne najviac žiadúcim avermektínom.

Avermektíny a ich produkcia aerobnou fermentáciou kmeňov *S. avermimilis* sú opísané v patentoch United States Patents 4310519 a 4429042. Biosyntéza prirodzených avermektínov je pravdepodobne zahajovaná endogénne z CoA tioesterových analógov kyseliny izomaslovej a kyseliny S-(+)-2-metylmaslovej.

Kombinácia zlepšenia kmeňa náhodnou mutagenéziou aj použitie exogénne dodaných mastných kyselín viedlo na účinnú tvorbu analóg avermektínu. Mutanty *S. avermimilis* s deficienciou dehydrogenázy 2-oxo kyselín (bkd deficientné mutanty) môžu produkovať avermektíny len, keď sú fermentácie suplementované mastnými kyselinami. Vyhľadávanie a izolácia mutantov s deficienciou dehydrogenázovej aktivity vetvených reťazcov (napríklad *S. avermimilis*, ATCC 535567) sú opísané v patente European Patent (EP) 276103. Fermentácia takých mutantov v prítomnosti exogénne dodaných mastných kyselín vedie na produkciu len štyroch avermektínov zodpovedajúcich použitým mastným kyselinám. Takto dochádza suplementáciou fermentáciou *S. avermimilis* (ATCC 535567) S-(+)-2-metylmaslovou kyselinou na tvorbu prirodzených avermektínov A1a, A2a, B1a a B2a, suplementácia fermentáciou kyselinou izomaslovou vedie na tvorbu prirodzených avermektínov A1b, A2b, B1b a B2b, a suplementácia fermentáciou kyselinou cyklopentankarboxylovou vedie na tvorbu štyroch nových cyklopentylavermektínov A1, A2, B1 a B2.

Pokiaľ je uskutočnená suplementácia inými mastnými kyselinami, dochádza na tvorbu nových avermektínov. Vyhľadávaním viac ako 800 potenciálnych prekursorov bolo identifikovaných viac ako 60 ďalších nových avermektínov (pozri napríklad Dutton et al., 1991, J Antibiot 44:357-367, a Banks et al., 1994, Roy Soc Chem 147:16-26). Mutanty *S. avermitilis* s deficienciou aktivity 5-O-metyltransferázy navyše produkujú zásadne len B analógové avermektíny. Mutanty *S. avermitilis* bez aktivity dehydrogenázy vetvených 2-oxo kyselín aj 5-O-metyltransferázy produkujú len B avermektíny zodpovedajúce mastným kyselinám použitým na suplementáciu fermentácie. Suplementácia takých dvojitéch mutantov S-(+)-2-metylmaslovou kyselinou vedie na tvorbu len prirodzených avermektínov B1a a B2, zatiaľ čo suplementácia kyselinou izomaslovou alebo cyklopentankarboxylovou vedie na tvorbu prirodzených avermektínov B1b a B2b, alebo nových cyklopentyl B1 a B2 avermektínov. Suplementácia dvojitéch zmutovaných kmeňov cyklohexan karboxylovou kyselinou je prednostný spôsob na produkciu komerčne dôležitého nového avermektínu, cyklohexylavermektínu B1 (doramektínu). Izolácia a charakteristiky takých dvojitéch mutantov, napríklad *S. avermitilis* (ATCC 53692) sú opísané v EP 276103.

2.2. Gény hrajúce úlohu v biosyntéze avermektínov

V mnohých prípadoch sú gény hrajúce úlohu v produkcii sekundárnych metabolitov a gény kódujúce konkrétne antibiotikum nachádzajú v zhlukoch na chromozóme. Toto je prípad napríklad zhlukov génov *Streptomyces* pre polyketíd syntázu (PKS) (pozri Hopwood a Sherman, 1990, Ann Rev Genet 24:37-66). Jednou zo stratégií klonovania génov v biosyntetickej dráhe bola izolácia génu pre liekovú rezistenciu a potom testovanie príslušných oblastí chromozómu

na ďalšie gény majúce vzťah na biosyntézu takého konkrétneho antibiotika. Ďalšia zo stratégií klonovania génov hrajúcich úlohu v biosyntéze dôležitých metabolitov bola komplementácia mutantov. Časti DNA knižnice z organizmu produkujúceho konkrétny metabolit sú vložené do neprodukujúceho mutovaného kmeňa a transformované kmene sú vyhľadávané podľa tvorby metabolitu. Navyše bola použitá na identifikáciu a klonovanie génov v biosyntetických dráhach hybridizácia knižnice za použitia prób odvodených z kmeňov *Streptomyces*.

Gény hrajúce úlohu v biosyntéze avermektínu (ave gény), podobne ako gény vyžadované pre biosyntézu iných sekundárnych metabolitov *Streptomyces* (napríklad PKS) sa nachádzajú v zhlukoch na chromozóme. Za použitia vektorov na komplementáciu mutantov *S. avermitilis* s blokádu biosyntézy avermektínu bol úspešne naklonovaný celý rad ave génov. Klonovanie takých génov je opísané v patente US Patent 5252474. Ikeda et al. 1995, *J Antibiot* 48:532-534 navyše opísal lokalizáciu chromozomálnej oblasti obsahujúcej C22,23 dehydratačný krok (aveC) na fragmente *S. avermitilis* 4,82 Kb BamHI, rovnako tak ako mutácie v gène aveC, ktoré vedú na produkciu jedného komponentu B2a. Pretože ivermektín, účinná antihelmintická zlúčenina, môže byť chemicky produkovaná z avermektínu B2a, je tento kmeň produkujúci jeden komponent avermektínu B2a považovaný za obzvlášť užitočný na komerčnú tvorbu ivermektínu.

Identifikácia mutácií aveC génu, ktoré minimalizujú komplexnosť tvorby avermektínu, ako sú napríklad mutácie, ktoré znižujú pomer B2:B1 avermektínov, by mohli zjednodušiť produkciu a purifikáciu komerčne dôležitých avermektínov.

3. Opis vynálezu

Predkladaný vynález poskytuje izolovanú polynukleotídovú molekulu obsahujúcu kompletný aveC ORF *S. avermitilis* alebo jeho významnú časť, a táto izolovaná polynukleotídová molekula je bez ďalšieho kompletného ORF, ktorý je lokalizovaný smerom dole od aveC ORF in situ na chromozóme *S. avermitilis*. Izolovaná polynukleotídová molekula, ktorá je predmetom predkladaného vynálezu obsahuje prednostne nukleotídovú sekvenciu, ktorá je rovnaká ako produkt génu AveC *S. avermitilis* kódujúci sekvenciu plazmidu pSE186 (ATCC 209604), alebo ktorá je rovnaká ako nukleotídová sekvencia aveC ORF z Obrázku 1 (SEQ ID č. 1), alebo jej významná časť. Predkladaný vynález ďalej zahŕňa nukleotídovú sekvenciu SEQ ID č.1, alebo jej degenerovaný variant.

Predkladaný vynález ďalej poskytuje izolovanú polynukleotídovú molekulu majúcu nukleotídovú sekvenciu, ktorá je homológna s produktom génu AveC *S. avermitilis* kódujúcim sekvenciu plazmidu pSE186 (ATCC 209604), alebo ktorá je rovnaká ako nukleotídová sekvencia aveC ORF z Obrázku 1 (SEQ ID č. 1), alebo ako jej významná časť.

Predkladaný vynález ďalej poskytuje izolovanú polynukleotídovú molekulu obsahujúcu nukleotídovú sekvenciu, ktorá kóduje polypeptíd majúci amínokyselinovú sekvenciu, ktorá je homológna s produktom génu AveC *S. avermitilis* kódujúcim sekvenciu plazmidu pSE186 (ATCC 209604), alebo ako amínokyselinová sekvencia z Obrázku 1 (SEQ ID č. 2), alebo ako jej významná časť.

Predkladaný vynález ďalej poskytuje izolovanú polynukleotídovú molekulu obsahujúcu nukleotídovú sekvenciu

kódujúcu homológny AveC génový produkt. V prednostnej forme vynálezu obsahuje izolovaná polynukleotídová molekula nukleotídovú sekvenciu kódujúcu homológny AveC produkt génu *S. hygroscopicus*, a tento homológny génový produkt obsahuje amínokyselinovú sekvenciu SEQ ID č:4, alebo jej významnú časť. V prednostnej forme vynálezu obsahuje izolovaná polynukleotídová molekula, ktorá je predmetom vynálezu, a ktorá kóduje homológny AveC produkt, nukleotídovú sekvenciu SEQ ID č:3, alebo jej významnú časť.

Predkladaný vynález ďalej poskytuje izolovanú polynukleotídovú molekulu obsahujúcu nukleotídovú sekvenciu, ktorá je homológna s nukleotídovou sekvenciou SEQ ID NO:3. Predkladaný vynález ďalej poskytuje izolovanú polynukleotídovú molekulu obsahujúcu nukleotídovú sekvenciu, ktorá kóduje polypeptíd, ktorý je homológny s homologným AveC produktom génu *S. hygroscopicus*, majúci amínokyselinovú sekvenciu SEQ ID č.4.

Predkladaný vynález ďalej poskytuje oligonukleotídy, ktoré hybridizujú s polynukleotídovou molekulou majúcou nukleotídovú sekvenciu uvedenú na Obrázku 1 (SEQ ID č. 1), alebo SEQ ID č. 3, alebo s polynukleotídovou molekulou majúcou nukleotídovú sekvenciu, ktorá je komplementárna s nukleotídovou sekvenciou uvedenou na Obrázku 1 (SEQ ID č. 1), alebo SEQ ID č. 3.

Predkladaný vynález ďalej poskytuje rekombinantné klonovacie vektory a expresné vektory, ktoré sú užitočné na klonovanie a expresiu polynukleotídu, ktorý je predmetom predkladaného vynálezu, vrátane polynukleotídových molekúl obsahujúcich aveC ORF *S. avermitilis* alebo aveC homológny ORF. V nelimitujúcej forme vynálezu poskytuje predkladaný vynález

plazmid pSE186 (ATCC 209604), ktorý obsahuje celý ORF aveC génu *S. avermitilis*. Predkladaný vynález ďalej poskytuje transformované hostiteľské bunky obsahujúce polynukleotídovú molekulu alebo rekombinantný vektor, ktorý je predmetom vynálezu, a nové kmene, alebo bunkové línie od nich odvodené.

Predkladaný vynález ďalej poskytuje rekombinantne exprimovaný AveC génový produkt alebo AveC homológny génový produkt, alebo ich významnú časť. Predkladaný vynález ďalej poskytuje spôsob produkcie rekombinantného AveC génového produktu, zahŕňajúci kultiváciu transformovanej hostiteľskej bunky s rekombinantným expresným vektorom, kde zmienený rekombinantný expresný vektor obsahuje polynukleotídovú molekulu majúcu nukleotídovú sekvenciu kódujúcu AveC génový produkt alebo AveC homológny génový produkt, a táto polynukleotídová molekula je v operačnom spojení s jedným alebo viacerými regulačnými elementami, ktoré kontrolujú expresiu polynukleotídovej molekuly hostiteľskej bunky, za podmienok pomáhajúcich produkcii rekombinantného AveC génového produktu alebo AveC homológneho génového produktu, a zahŕňajúci získanie AveC génového produktu alebo AveC homológneho génového produktu z bunkovej kultúry.

Predkladaný vynález ďalej poskytuje polynukleotídovú molekulu obsahujúcu nukleotídovú sekvenciu, ktorá je inak rovnaká ako AveC alela *S. avermitilis*, alebo AveC génový produkt kódujúci sekvenciu plazmidu pSE186 (ATCC 209604), alebo jej degenerovaný variant, alebo nukleotídovú sekvenciu aveC ORF *S. avermitilis*, ako je uvedené na Obrázku 1 (SEQ ID č. 1), alebo jej degenerovaný variant, ale ktorá ďalej obsahuje jednu alebo viacej mutácií, takže bunky kmeňa *S. avermitilis* ATCC 53692, v ktorých bola divoká aveC alela inaktivovaná, a ktorá exprimuje polynukleotídovú molekulu

obsahujúcu zmutovanú nukleotídovú sekvenciu, produkujú odlišný pomer alebo množstvo avermektínov, ktoré sú produkované bunkami kmeňa *S. avermitilis* ATCC 53692, ktoré miesto toho exprimujú len divoký typ *aveC* alely. Podľa predkladaného vynálezu môžu byť takéto polynukleotídové molekuly použité na produkciu nových kmeňov *S. avermitilis*, ktoré vykazujú detekovateľnú zmenu v produkcii avermektínu v porovnaní s rovnakým kmeňom, ktorý miesto toho exprimuje len divoký typ *aveC* alely. V prednostnej forme vynálezu sú takéto polynukleotídové molekuly užitočné na produkciu nových kmeňov *S. avermitilis*, ktoré produkujú avermektíny v zníženom pomere 2:1, v porovnaní s rovnakým kmeňom, ktorý miesto toho exprimuje len divoký typ *aveC* alely. V ďalšej prednostnej forme vynálezu sú takéto polynukleotídové molekuly užitočné na produkciu nových kmeňov *S. avermitilis*, ktoré produkujú zvýšené množstvá avermektínov v porovnaní s rovnakým kmeňom, ktorý miesto toho exprimuje len jednu divokú *aveC* alelu. V ďalšej prednostnej forme vynálezu sú takéto polynukleotídové molekuly užitočné na produkciu nových kmeňov *S. avermitilis*, v ktorých bol *aveC* gén inaktivovaný.

Predkladaný vynález poskytuje spôsoby identifikácie mutácií *aveC* ORF *S. avermitilis* schopných zmeniť pomer a/alebo množstvo produkovaných avermektínov. V prednostnej forme vynálezu poskytuje predkladaný vynález spôsob identifikácie mutácií *aveC* ORF schopných zmeniť pomer triedy 2:1 produkovaných avermektínov, a tento spôsob zahŕňa: (a) určenie pomeru triedy 2:1 avermektínov produkovaných bunkami kmeňa *S. avermitilis*, v ktorých bola natívna *aveC* alela inaktivovaná, a do ktorých bola vložená polynukleotídová molekula obsahujúca nukleotídovú sekvenciu kódujúcu zmutovaný *AveC* génový produkt, a táto molekula je exprimovaná; (b) určenie pomeru triedy 2:1 avermektínov produkovaných bunkami rovnakého kmeňa *S.*

avermitilis ako v kroku (a), ale tieto bunky miesto toho exprimujú len divoký typ aveC alely alebo ORF z Obrázku 1 (SEQ ID č. 1), alebo nukleotídovú sekvenciu, ktorá je k ORF homológna; a (c) porovnanie pomeru triedy 2:1 avermektínov produkovaných bunkami S. avermitilis z kroku (a) s pomerom triedy 2:1 avermektínov produkovaných bunkami S. avermitilis z kroku (b); takže keď je pomer triedy 2:1 avermektínov produkovaných bunkami S. avermitilis z kroku (a) odlišný od pomeru triedy 2:1 avermektínov produkovaných bunkami S. avermitilis z kroku (b), potom môže byť identifikovaná mutácia aveC ORF schopná zmeniť pomer triedy 2:1 avermektínov. V prednostnej forme vynálezu je pomer triedy 2:1 avermektínov touto mutáciou znížený.

V ďalšej prednostnej forme poskytuje predkladaný vynález spôsoby identifikácie mutácií aveC ORF alebo genetických konštruktov obsahujúcich aveC ORF schopných zmeniť množstvo produkovaných avermektínov, a tento spôsob zahŕňa: (a) určenie množstva avermektínov produkovaných bunkami kmeňa S. avermitilis, v ktorých bola natívna aveC alela inaktivovaná, a do ktorých bola vložená polynukleotídová molekula obsahujúca nukleotídovú sekvenciu kódujúcu zmutovaný AveC génový produkt, alebo obsahujúca genetický konštrukt zahŕňajúci nukleotídovú sekvenciu kódujúcu AveC génový produkt a táto molekula je exprimovaná; (b) určenie množstva avermektínov produkovaných rovnakým kmeňom S. avermitilis ako v kroku (a), ale tento kmeň miesto toho exprimuje len jednu aveC alelu majúcu nukleotídovú sekvenciu ako ORF z Obrázku 1 (SEQ ID č. 1), alebo nukleotídovú sekvenciu, ktorá je k ORF homológna ; a (c) porovnanie množstva avermektínov produkovaných bunkami S. avermitilis z kroku (a) s množstvom avermektínov produkovaných bunkami S. avermitilis z kroku (b); takže keď je množstvo avermektínov produkovaných bunkami S. avermitilis z kroku (a)

odlišné od množstva avermektínov produkovaných bunkami *S. avermitilis* z kroku (b), potom môže byť identifikovaná mutácia *aveC* ORF alebo genetického konštruktú schopná zmeniť pomer triedy 2:1 avermektínov. V prednostnej forme vynálezu je produkované množstvo avermektínov touto mutáciou zvýšené.

Predkladaný vynález ďalej poskytuje rekombinantné vektory, ktoré sú užitočné na prípravu nových kmeňov *S. avermitilis* s narušenou produkciou avermektínov. Predkladaný vynález navyše poskytuje vektory, ktoré môžu byť použité na cielenie ktorýchkoľvek polynukleotídových molekúl obsahujúcich mutované nukleotídové sekvencie, ktoré sú predmetom predkladaného vynálezu, do miesta *aveC* génu chromozómu *S. avermitilis* buď na inzerciu alebo na nahradenie *aveC* alely alebo ORF alebo ich časti pomocou homológnej rekombinácie. Podľa predkladaného vynálezu tu ale môže poskytnutá polynukleotídová molekula obsahujúca mutovanú nukleotídovú sekvenciu, ktorá je predmetom predkladaného vynálezu, tiež modulovať biosyntézu avermektínov, keď je inzerovaná do chromozómu *S. avermitilis* do miesta iného, ako je miesto *aveC* génu, alebo keď je v bunkách *S. avermitilis* udržiavaná epizomálne. Predkladaný vynález teda poskytuje tiež vektory obsahujúce mutovanú polynukleotídovú molekulu obsahujúcu mutovanú nukleotídovú sekvenciu, ktorá je predmetom predkladaného vynálezu, a tieto vektory môžu byť použité na inzerciu polynukleotídovej molekuly do miesta v chromozóme *S. avermitilis* iného, ako je miesto *aveC* génu, alebo ktorá môže byť v týchto bunkách udržiavaná epizomálne. V prednostnej forme poskytuje predkladaný vynález vektory na náhradu génu, ktoré môžu byť použité na inzerciu mutovanej *aveC* alely do chromozómu *S. avermitilis* za účelom tvorby nových kmeňov buniek, ktoré produkujú avermektíny v zníženom pomere triedy

2:1 v porovnaní s bunkami rovnakého kmeňa, ktoré exprimujú len divoký typ aveC alely.

Predkladaný vynález ďalej poskytuje spôsoby prípravy nových kmeňov *S. avermitilis* zahŕňajúce bunky, ktoré exprimujú mutovanú aveC alelu, čím vznikajú narušené pomery a/alebo množstvá avermektínov v porovnaní s bunkami rovnakého kmeňa *S. avermitilis*, ktoré exprimujú len divoký typ aveC alely. V prednostnej forme vynálezu poskytuje predkladaný vynález spôsoby prípravy nových kmeňov *S. avermitilis* obsahujúcich bunky, ktoré exprimujú mutovanú aveC alelu, čím vzniká narušený pomer triedy 2:1 avermektínov v porovnaní s bunkami rovnakého kmeňa *S. avermitilis*, ktoré exprimujú len divoký typ aveC alely, ďalej zahŕňajúce transformujúce bunky kmeňa *S. avermitilis* s vektorom, ktorý nesie mutovanú aveC alelu kódujúcu génový produkt, ktorý narušuje pomer triedy 2:1 avermektínov produkovaných bunkami kmeňa *S. avermitilis*, ktoré exprimujú mutovaný typ aveC alely v porovnaní s bunkami rovnakého kmeňa *S. avermitilis*, ktoré exprimujú len divoký typ aveC alely, a ďalej výber transformovaných buniek, ktoré produkujú avermektíny v narušenom pomere triedy 2:1 avermektínov v porovnaní s pomerom triedy 2:1 produkovaným bunkami kmeňa *S. avermitilis*, ktoré exprimujú len divoký typ aveC alely. V prednostnej forme vynálezu je znížený pomer triedy 2:1 avermektínov produkovaných v bunkách nového kmeňa.

V ďalšej prednostnej forme poskytuje predkladaný vynález spôsoby prípravy nových kmeňov *S. avermitilis* zahŕňajúce bunky, ktoré produkujú narušené množstvá avermektínov, zahŕňajúce transformujúce bunky kmeňa *S. avermitilis* s vektorom, ktorý nesie mutovanú aveC alelu alebo genetický konštrukt obsahujúci aveC alelu, ktorých expresia vedie na narušené množstvo avermektínov produkovaných bunkami kmeňa *S.*

avermitilis, ktoré exprimujú mutovanú aveC alelu alebo genetický konštrukt v porovnaní s bunkami rovnakého kmeňa S. avermitilis, ktoré exprimujú len divoký typ aveC alely, a ďalej zahŕňajúce výber transformovaných buniek, ktoré produkujú avermektíny v narušenom množstve v porovnaní s množstvom avermektínov produkovaných bunkami kmeňa S. avermitilis, ktoré exprimujú len divoký typ aveC alely. V prednostnej forme vynálezu je množstvo avermektínov produkovaných v bunkách nového kmeňa zvýšené.

V ďalšej prednostnej forme poskytuje predkladaný vynález spôsoby prípravy nových kmeňov S. avermitilis, ktorých bunky obsahujú inaktivovanú aveC alelu, obsahujúcu transformujúce bunky kmeňa S. avermitilis, ktoré exprimujú ktorúkoľvek aveC alelu s vektorom, ktorý inaktivuje aveC alelu a ďalej výber transformovaných buniek, v ktorých bola aveC alela inaktivovaná.

Predkladaný vynález ďalej poskytuje nové kmene S. avermitilis, ktoré boli transformované ktoroukoľvek polynukleotídovou molekulou alebo vektormi obsahujúcimi mutované nukleotídové sekvencie, ktoré sú predmetom predkladaného vynálezu. V prednostnej forme poskytuje predkladaný vynález nové kmene S. avermitilis zahŕňajúce bunky, ktoré exprimujú mutovanú aveC alelu na miesto alebo navyše k divokému typu aveC alely, kde bunky nového kmeňa produkujú avermektíny v narušenom pomere triedy 2:1 v porovnaní s bunkami rovnakého kmeňa S. avermitilis, ktoré exprimujú len divoký typ aveC alely. V prednostnej forme vynálezu produkuje nový kmeň avermektíny v narušenom pomere triedy 2:1 v porovnaní s bunkami rovnakého kmeňa S. avermitilis, ktoré exprimujú len divoký typ aveC alely. Takéto

nové kmene sú užitočné na produkciu komerčne žiadúcich avermektínov, ako je napríklad doramektín, vo veľkej mierke.

V ďalšej prednostnej forme vynálezu poskytuje predkladaný vynález nové kmene *S. avermitilis*, ktoré exprimujú mutovanú *aveC* alelu alebo genetický konštrukt obsahujúci *aveC* alelu na miesto alebo navyše k natívnej *aveC* alele, čo vedie na bunkovú produkciu narušeného množstva avermektínov v porovnaní s množstvom avermektínov produkovaných bunkami rovnakého kmeňa *S. avermitilis*, ktoré exprimujú len divoký typ *aveC* alely. V prednostnej forme vynálezu produkujú nové bunky zvýšené množstvo avermektínov.

V ďalšej prednostnej forme vynálezu poskytuje predkladaný vynález nové kmene *S. avermitilis* obsahujúce bunky, v ktorých bol *aveC* gén inaktivovaný. Takéto kmene sú užitočné na rôzne spektrum avermektínov, ktoré tieto bunky produkujú v porovnaní s divokým kmeňom, aj na komplementáciu vyhladávacích analýz, ako sú tu opísané, aby sa určilo, či cielená alebo náhodná mutagenézia *aveC* génu ovplyvňuje produkciu avermektínov.

Predkladaný vynález ďalej poskytuje postup produkcie avermektínov zahŕňajúci kultiváciu buniek kmeňa *S. avermitilis*, a tieto bunky exprimujú mutovanú *aveC* alelu, ktorá kóduje génový produkt, ktorý alteruje pomer triedy 2:1 avermektínov produkovaných bunkami kmeňa *S. avermitilis* exprimujúcimi mutovanú *aveC* alelu v porovnaní s bunkami rovnakého kmeňa *S. avermitilis*, ktoré exprimujú len divoký typ *aveC* alely v kultivačnom médiu za podmienok, ktoré z nich umožňujú alebo indukujú produkciu avermektínov, a získanie zmienených avermektínov z kultúry. V prednostnej forme vynálezu je znížený pomer triedy 2:1 avermektínov produkovaných bunkami exprimujúcich mutáciu. Postup poskytuje

zvýšenú účinnosť produkcie komerčne hodnotných avermektínov, ako je napríklad doramectín.

Predkladaný vynález ďalej poskytuje postup produkcie avermektínov zahŕňajúci kultiváciu buniek kmeňa *S. avermitilis*, a tieto bunky exprimujú mutovanú *aveC* alelu alebo genetický konštrukt obsahujúci *aveC* alelu, ktoré vedú na narušené množstvo avermektínov produkovaných bunkami kmeňa *S. avermitilis* exprimujúcimi mutovanú *aveC* alelu alebo genetický konštrukt v porovnaní s bunkami rovnakého kmeňa *S. avermitilis*, ktoré neexprimujú len mutovanú *aveC* alelu alebo genetický konštrukt, ale miesto toho exprimujú len divoký typ *aveC* alely, v kultivačnom médiu za podmienok, ktoré z nich umožňujú alebo indukujú produkciu avermektínov, a tento spôsob zahŕňa ďalej získanie zmienených avermektínov z kultúry. V prednostnej forme vynálezu je zvýšené množstvo avermektínov produkovaných bunkami exprimujúcich mutáciu alebo genetický konštrukt.

Predkladaný vynález ďalej poskytuje nové zloženie avermektínov produkované kmeňom *S. avermitilis* exprimujúcim mutovanú *aveC* alelu, ktorá je predmetom predkladaného vynálezu, kde sú avermektíny produkované v zníženom pomere triedy 2:1 v porovnaní pomerom 2:1 triedy avermektínov produkovaných bunkami rovnakého kmeňa *S. avermitilis*, ktoré neexprimujú mutovanú *aveC* alelu, ale miesto toho exprimujú len divoký typ *aveC* alely. Nové zloženie avermektínov môže byť prítomné, ako je produkované vo fermentačnej kultivačnej tekutine, alebo z nej môže byť stiahnuté alebo môže byť z nej významne purifikované.

4. Prehľad obrázkov na výkresoch

Obrázok 1. DNA sekvencia (SEQ ID č. 1) obsahujúca aveC ORF *S. avermitilis* a odvodenú amínokyselinovú sekvenciu (SEQ ID č. 2).

Obrázok 2. Plazmidový vektor pSE186 (ATCC 209604) obsahujúci celý ORF aveC génu *S. avermitilis*.

Obrázok 3. gén nahradzujúci vektor pSE180 (ATCC 209605) obsahujúci ermE gén *Sacc. erythraea* inzerovaný do aveC ORF *S. avermitilis*.

Obrázok 4. BamHI restriekčná mapa zhluokov génov pre avermektín polyketíd syntázu zo *S. avermitilis* s identifikovanými piatimi presahujúcimi kozmidovými klonmi (to je pSE65, pSE 66, pSE67, pSE68, pSE69). Uvedený je tiež vzťah pSE118 a PSE119.

Obrázok 5. HPLC analýza fermentačných produktov produkovaných kmeňmi *S. avermitilis*. Kvantifikácia vrcholu bola usutočená porovnaním množstva štandard cyklohexylu B1. Retenčný čas cyklohexylu B2 bol 7,4-7,7 minúty, retenčný čas cyklohexylu B1 bol 11,9-12,3 minúty. Obrázok 5A. Kmeň *S. avermitilis* SE180-11 s inaktivovaným aveC ORF. Obr. 5B. Kmeň *S. avermitilis* SE180-11 transformovaný pomocou pSE187. Obr. 5D. Kmeň *S. avermitilis* SE180-11 transformovaný pomocou pSE188.

Obrázok 6. Porovnanie vyvodených amínokyselinových sekvencií kódovaných aveC ORF *S. avermitilis* (SEQ ID č.2), aveC homológny čiasočným ORF z *S. griseochromogenes* (SEQ ID č.5), a aveC homológny ORF z *S. hygrosopicus* (SEQ ID č.4). Valínové rezíduum označené hrubo je myslené štartovacie miesto pre bielkovinu. Konzervované rezíduá sú uvedené veľkými

písmenami pre homológiu vo všetkých troch sekvenciách a malými písmenami pre homológiu v dvoch z troch sekvencií. Aminokyselinové sekvencie majú približne 50% identitu sekvencií.

Obrázok 7. Hybridný plazmidový konštrukt obsahujúci 564 bp BsaAI/KpnI fragment z *S. hygroscopicus* aveC homológneho génu inzerovaného do BaaAI/KpnI miesta v *S. avermitilis* aveC ORF.

5. Detailný opis vynálezu

Predkladaný vynález sa týka identifikácie a charakterizácie polynukleotídových molekúl majúcich nukleotídové sekvencie, ktoré kódujú aveC génový produkt zo *Streptomyces avermitilis*, konštrukcie nových kmeňov *S. avermitilis*, ktoré môžu byť použité na vyhľadávanie mutovaných AveC génových produktov pre ich efekt na produkciu avermektínov, a objave, že určité mutované AveC génové produkty môžu znižovať pomer B2:B1 avermektínov produkovaných *S. avermitilis*. Vynález je opísaný príkladom v častiach uvedených nižšie ako polynukleotídová molekula majúca buď nukleotídovú sekvenciu, ktorá je rovnaká ako pre *S. avermitilis* AveC génový produkt kódujúci sekvenciu plazmidu pSE186 (ATCC 209604) alebo nukleotídovú sekvenciu ORF uvedenú na Obrázku 1 (SEQ ID č.1), a polynukleotídové molekuly majúce z nich odvodené mutované nukleotídové sekvencie a ich degenerované varianty. Princípy uvedené v predkladanom vynáleze ale môžu byť analogicky aplikované na ďalšie polynukleotídové molekuly, vrátane aveC homológnych génov z iných druhov *Streptomyces*, zahŕňajúce medzi inými napríklad *S. hygroscopicus* a *S. griseochromogenes*.

5.1 Polynukleotídové molekuly kódujúce *S. avermitilis* AveC génový produkt

Predkladaný vynález poskytuje izolovanú polynukleotídovú molekulu obsahujúcu kompletný aveC ORF *S. avermitilis* alebo jeho významnú časť, a táto izolovaná polynukleotídová molekula je bez ďalšieho kompletného ORF, ktorý je lokalizovaný smerom dole od ORF in situ na chromozóme *S. avermitilis*.

Izolovaná polynukleotídová molekula, ktorá je predmetom predkladaného vynálezu obsahuje prednostne nukleotídovú sekvenciu, ktorá je rovnaká, ako je *S. avermitilis* AveC génový produkt kódujúci sekvenciu plazmidu pSE186 (ATCC 209604), alebo je rovnaká ako nukleotídová sekvencia ORF z Obrázku 1 (SEQ ID č.1), alebo jej významná časť. Ako je tu použité, "významná časť" izolovanej polynukleotídovej molekuly obsahujúca nukleotídový kódujúci *S. avermitilis* AveC génový produkt znamená izolovanú polynukleotídovú molekulu obsahujúcu aspoň 70% kompletný aveC ORF sekvencie uvedenej na Obrázku 1 (SEQ ID č.1), ktorý kóduje funkčne ekvivalentný AveC génový produkt. V tomto ohľade je "funkčne ekvivalentný" AveC génový produkt definovaný ako génový produkt, ktorý keď je exprimovaný v kmeni *S. avermitilis* ATCC 53692, v ktorom bola natívna aveC alela inaktivovaná, vedie na produkciu významne rovnakého pomeru a množstva avermektínov, ako je produkované kmeňom *S. avermitilis* ATCC 53692, ktorý exprimuje len divokú, funkčnú aveC alelu natívnu pre kmeň *S. avermitilis* ATCC 53692.

Navyše k nukleotídovej sekvencii aveC ORF môže izolovaná polynukleotídová molekula, ktorá je predmetom predkladaného vynálezu, ďalej obsahovať nukleotídové sekvencie, ktoré prirodzene hraničia s aveC génom in situ v *S. avermitilis*, ako

sú napríklad hraničiace nukleotídové sekvencie uvedené na Obrázku 1 (SEQ ID č. 1).

Predkladaný vynález ďalej poskytuje izolovanú polynukleotídovú molekulu obsahujúcu nukleotídovú sekvenciu SEQ ID č. 1, alebo jej degenerovaný variant.

Ako je tu používané, týkajú sa termíny "polynukleotídová molekula", "polynukleotídová sekvencia", "kódujúca sekvencia", "otvorený čítací rámeček" a "ORF", DNA aj RNA molekúl, ktoré môžu byť buď jednovláknové alebo dvojvláknové, a ktoré môžu byť transkribované alebo translatované (DNA), alebo translatované (RNA) do AveC génového produktu, alebo do polypeptidu, ktorý je homológny s AveC génovým produktom alebo s AveC homológnym génovým produktom v príslušnom expresnom systéme hostiteľskej bunky, keď je pod kontrolou príslušných regulačných elementov. Kódujúca sekvencia môže zahŕňať, ale nie je obmedzená na prokaryotické sekvencie, cDNA sekvencie, genomické DNA sekvencie a chemicky syntetizované DNA a RNA sekvencie.

Nukleotídová sekvencia uvedená na Obrázku 1 (SEQ ID č. 1) zahŕňa štyri odlišné GTG kodóny v pozíciách bp 42, 174, 177 a 180. Ako je uvedené nižšie konštruovalo sa veľa delécií 5'-oblasti aveC ORF (Obrázok 1, SEQ ID č. 1), aby sa pomohlo definovať, ktorý z týchto kodónov by mohol fungovať v aveC ORF ako štarovacie miesto na expresiu bielkovín. Delécie prvého GTG miesta v pozícii 42 bp neeliminovali AveC aktivitu. Ďalšie delécie všetkých GTG kodónov v pozíciách 174, 177 a 180 bp spoločne eliminovali AveC aktivitu, čo ukazuje, že táto oblasť je potrebná na expresiu bielkovín. Predkladaný vynález teda zahŕňa aveC ORF s variabilnou dĺžkou.

Predkladaný vynález ďalej poskytuje polynukleotídovú molekulu majúcu nukleotídovú sekvenciu, ktorá je homológna s *S. avermitilis* AveC génový produkt-kódujúcou sekvenciou plazmidu pSE186 (ATC 209604), alebo s nukleotídovou sekvenciou aveC ORF prezentovanou na Obrázku 1 (SEQ ID č. 1) alebo s jej významnou časťou. Termín "homológny", keď je použitý vo vzťahu k polynukleotídovej molekule, ktorá je homológna s *S. avermitilis* AveC génový produkt-kódujúcou sekvenciou, znamená polynukleotídovú molekulu majúcu nukleotídovú sekvenciu: a) ktorá kóduje rovnaký AveC génový produkt ako *S. avermitilis* génový produkt-kódujúcu sekvenciu plazmidu pSE186 (ATCC 209604), alebo ktorá kóduje rovnaký AveC génový produkt, ako je nukleotídová sekvencia aveC ORF prezentovaná na Obrázku 1 (SEQ ID č. 1), ale ktorá zahŕňa jednu alebo viacej nemých zmien nukleotídovej sekvencie podľa degenerácie genetického kódu (to je degeneračný variant); alebo b) ktorá hybridizuje, aby skomplementovala polynukleotídovú molekulu majúcu nukleotídovú sekvenciu, ktorá kóduje AveC génový produkt-kódujúci sekvenciu plazmidu pSE186 (ATCC 209604), alebo ktorá kóduje amínokyselinovú sekvenciu uvedenú na Obrázku 1 (SEQ ID č. 2) za mierne prísnych podmienok, to je hybridizácia na odfiltrovanie naviazanej DNA v 0,5 M NaHPO₄, 7% sodnom dodecylsulfáte (SDS), 1 mM EDTA pri teplote 65°C, a premytie v 0,2 x SSC/0,1% SDS pri teplote 42°C (pozri Ausubel et al. (eds), 1989, Current Protocols in Molecular Biology, Sv. I, Green Publishing Associates, Inc, a John Wiley and Sons, Inc, New York, strana 2.10.3), ktorá kóduje funkčne ekvivalentný AveC génový produkt, ako je definované vyššie. V prednostnej forme hybridizuje homológna polynukleotídová molekula, aby skomplementovala AveC génový produkt-kódujúcu sekvenciu plazmidu pSE186 (ATCC 209604), alebo skomplementovala nukleotídovú sekvenciu aveC ORF prezentovanú na Obrázku 1 (SEQ ID č. 1), alebo jej významnú časť za vysoko prísnych podmienok

to je hybridizácia na odfiltrovanie naviazanej DNA v 0,5 M NaHPO₄, 7% SDS, 1 mM EDTA pri teplote 65°C, a premytie v 0,1 x SSC/0,1% SDS pri teplote 68°C (pozri Ausubel et al., 1989, vyššie), ktorá kóduje funkčne ekvivalentný AveC génový produkt, ako je definované vyššie.

Aktivita AveC génového produktu a jeho potenciálne funkčných ekvivalentov môže byť určená HPLC analýzou fermentačných produktov, ako je opísané v príkladoch uskutočnenia vynálezu nižšie. Polynukleotídové molekuly majúce nukleotídové sekvencie, ktoré kódujú funkčné ekvivalenty *S. avermitilis* AveC génového produktu, zahŕňajú prirodzene sa vyskytujúce aveC gény prítomné v iných kmeňoch *S. avermitilis*, aveC homologné gény prítomné v iných druhoch *Streptomyces*, a mutované aveC alely prirodzene sa vyskytujúce alebo pripravené genetickým inžinierstvom.

Predkladaný vynález ďalej poskytuje polynukleotídovú molekulu obsahujúcu nukleotídovú sekvenciu, ktorá kóduje polypeptíd majúci amínokyselinovú sekvenciu, ktorá je homológna s amínokyselinovou sekvenciou kódovanou AveC génový produkt-kódujúcou sekvenciou plazmidu pSE186 (ATCC 209604), alebo amínokyselinovou sekvenciou z Obrázku 1 (SEQ ID č. 2) alebo s jej významnou časťou. Ako je tu použité, znamená "významná časť" amínokyselinovej sekvencie z Obrázku 1 (SEQ ID č. 2) polypeptíd obsahujúci okolo 70% amínokyselinovej sekvencie uvedenej na Obrázku 1 (SEQ ID č. 2), ktorá konštituuje funkčne ekvivalentný AveC génový produkt, ako je definované vyššie.

Ako je tu používané s odkazom na amínokyselinové sekvencie, ktoré sú homológne s amínokyselinovými sekvenciami AveC génového produktu *S. avermitilis*, týka sa termín

"homológny" polypeptídu, ktorý má inak amínokyselinovú sekvenciu uvedenú na Obrázku 1 (SEQ ID č. 2), ale v ktorom jedno alebo viacej amínokyselinových rezíduí je konzervatívne substituovaných odlišným amínokyselinovým rezíduom, kde zmienená amínokyselinová sekvencia má aspoň zhruba 70%, prednostnejšie aspoň zhruba 80%, a najprednostnejšie aspoň zhruba 90% identity amínokyselinovej sekvencie s polypeptídom kódovaným AveC génový produkt-kódujúcou sekvenciou plazmidu pSE186 (ATCC 209604) amínokyselinovej sekvencie z Obrázku 1 (SEQ ID č. 2), ako je určené ktorýmkoľvek štandardným algoritmom identity amínokyselinových sekvencií, ako je napríklad algoritmus BLASTP (GENBANK, NCBI), a kde taká konzervatívna substitúcia vedie na vznik funkčne ekvivalentného génového produktu, ako je definované vyššie. Konzervatívne amínokyselinové substitúcie sú dobre známe v odbore. Pravidlá na uskutočňovanie takých substitúcií zahŕňajú pravidlá opísané medzi inými Dayhofem MD, 1978, Nat Biomed Res Found, Washington, DC, sv. 5, Sup. 3. Konzervatívne amínokyselinové substitúcie sú špecifickejšie tie substitúcie, ktoré sa všeobecne uskutočňujú v rámci rodiny amínokyselín, ktoré sú príbuzné aciditou alebo polaritou. Geneticky kódované amínokyseliny sú všeobecne rozdelené do štyroch skupín: 1) kyslé = aspartát, glutamát; 2) bazické = lysín, arginín, histidín; 3) nepolárne = alanín, valín, leucín, izoleucín, prolín, fenylalanín, metionín, tryptofan; a 4) polárne bez náboja = glycín, asparagín, glutamín, cysteín, serín, treonín, tyrosín. Fenylalanín, tryptofan tyrosín sú tiež spoločne klasifikované ako aromatické amínokyseliny. Jedna alebo viacej náhrad v ktorejkoľvek konkrétnej skupine, napríklad náhrada leucínu za izoleucín alebo valín, alebo aspartátu za glutamát, alebo treonín za serín, alebo za ktorékoľvek iné amínokyselinové rezíduum so štrukturálne príbuzným amínokyselinovým rezíduom, napríklad amínokyselinové rezíduum

s podobnou aciditou alebo polaritou, alebo podobných v kombinácii týchto vlastností, budú mať všeobecne nevýznamný efekt na funkciu polypeptídu.

Predkladaný vynález ďalej poskytuje izolovanú polynukleotídovú molekulu obsahujúcu nukleotídovú sekvenciu kódujúcu AveC homológny génový produkt. Ako je tu používané, je "AveC homológny génový produkt" definovaný ako génový produkt majúci aspoň zhruba 50% amínokyselinovú sekvenčnú identitu s AveC génovým produktom *S. avermitilis* obsahujúcim amínokyselinovú sekvenciu kódovanú AveC génový produkt-kódujúcou sekvenciou plazmidu pSE186 (ATCC 209604), alebo amínokyselinové sekvencie uvedené na Obrázku 1 (SEQ ID č. 2), ako je určené ktorýmkoľvek štandardným algoritmom identity amínokyselinových sekvencií, ako je napríklad algoritmus BLASTP (GENBANK, NCBI). V neobmedzujúcej forme vynálezu je AveC homológny génový produkt zo *S. hygroscopicus* (Opísaný v prihláške EP 0298423; depozít FERM BP-1901) a obsahuje amínokyselinovú sekvenciu SEQ ID č.:4 alebo jej významnú časť. "Významná časť" amínokyselinovej sekvencie SEQ ID NO:4 znamená polypeptíd obsahujúci aspoň 70% amínokyselinovej sekvencie SEQ ID NO:4, a ktorý konštituje funkčne ekvivalentný AveC homológny génový produkt. "Funkčne ekvivalentný" AveC homológny génový produkt je definovaný ako génový produkt, ktorý keď je exprimovaný v kmeni *S. hygroscopicus* FERM BP-1901, v ktorom bola natívna aveC homológna alela inaktivovaná, vedie na produkciu významne rovnakého pomeru a množstva milbemycínov, ako sú produkované kmeňom *S. hygroscopicus* FERM BP-1901 exprimujúcim miesto divokého typu funkčnú aveC homológnu alelu natívnu kmeňu *S. hygroscopicus* FERM BP-1901. V neobmedzujúcej forme vynálezu obsahuje izolovaná polynukleotídová molekula, ktorá je predmetom predkladaného vynálezu, a ktorá kóduje *S. hygroscopicus* AveC homológny

génový produkt, nukleotídovú sekvenciu SEQ ID č.3 alebo jej významnú časť. V tomto ohľade znamená "významná časť" izolovanej polynukleotídovej molekuly obsahujúcej nukleotídovú sekvenciu SEQ ID č.3 izolovanú polynukleotídovú molekulu obsahujúcu aspoň 70% nukleotídovej sekvencie SEQ ID č.3, ktorá kóduje funkčne ekvivalentný AveC homológny génový produkt, ako je definované vyššie.

Predkladaný vynález ďalej poskytuje polynukleotídovú molekulu obsahujúcu nukleotídovú sekvenciu, ktorá je homológna s *S. hygroscopicus* nukleotídovou sekvenciou SEQ ID č. 3. Termín "homológny", keď je použitý na odkaz na polynukleotídovú molekulu obsahujúcu nukleotídovú sekvenciu, ktorá je homológna s *S. hygroscopicus* AveC homológny génový produkt-kódujúcou sekvenciou SEQ ID č.3, znamená polynukleotídovú molekulu majúcu nukleotídovú sekvenciu: a) ktorá kóduje rovnaký génový produkt, ako je nukleotídová sekvencia SEQ ID č.3, ale ktorá obsahuje jednu alebo viacej nemých zmien v nukleotídovej sekvencii podľa degenerácie genetického kódu (to je degenerovaný variant); alebo b) ktorá hybridizuje, aby komplementovala polynukleotídovú molekulu majúcu nukleotídovú sekvenciu, ktorá kóduje aminokyselinovú sekvenciu SEQ ID č.4 za mierne prísnych podmienok, to je hybridizácia na odfiltrovanie naviazanej DNA v 0,5 M NaHPO₄, 7% SDS, 1 mM EDTA pri teplote 65°C, a premytie v 0,2 x SSC/0,1% SDS pri teplote 42°C (pozri Ausubel et al. pozri vyššie), ktorá kóduje funkčne ekvivalentný AveC homológny génový produkt, ako je definované vyššie. V prednostnej forme vynálezu hybridizuje homológna polynukleotídová molekula, aby skomplementovala AveC génový produkt-kódujúci nukleotídovú sekvenciu SEQ ID č.3 za vysoko prísnych podmienok to je hybridizácia na odfiltrovanie naviazanej DNA v 0,5 M NaHPO₄, 7% SDS, 1 mM EDTA pri teplote 65°C, a premytie v 0,1 x

SSC/0,1% SDS pri teplote 68°C (pozri Ausubel et al., 1989, vyššie), ktorá kóduje funkčne ekvivalentný AveC génový produkt, ako je definované vyššie.

Predkladaný vynález ďalej poskytuje polynukleotídovú molekulu obsahujúcu nukleotídovú sekvenciu, ktorá kóduje polypeptíd, ktorý je homológny s *S. hygroscopicus* AveC homológnym génovým produktom. Ako je tu používané, týka sa termín "homológny" s odkazom na polypeptídy, ktoré sú homológne s AveC homológnym génovým produktom so sekvenciou SEQ ID č.4 zo *S. hygroscopicus*, polypeptídu, ktorý má inak amínokyselinovú sekvenciu SEQ ID č.4, ale v ktorej jedno alebo viacej amínokyselinových rezíduí bolo konzervatívne substituovaných odlišným amínokyselinovým rezíduom, ako je definované vyššie, kde zmienená amínokyselinová sekvencia má aspoň 70%, prednostnejšie aspoň 80%, najprednostnejšie aspoň 90% amínokyselinovú sekvenčnú identitu na polypeptíd so sekvenciou SEQ ID č.4, ako je určené ktorýmkoľvek štandardným algoritmom amínokyselinovej sekvenčnej identity, ako je napríklad algoritmus BLASTP (GENBANK), NCBI), kde taká konzervatívna substitúcia vedie na funkčne ekvivalentný AveC homológny génový produkt, ako je definované vyššie.

Predkladaný vynález ďalej poskytuje oligonukleotídy, ktoré hybridizujú s polynukleotídovou molekulou majúcou nukleotídovú sekvenciu uvedenú na Obrázku 1 (SEQ ID č. 1) alebo SEQ ID č. 3, alebo polynukleotídovú molekulu majúcu nukleotídovú sekvenciu, ktorá je komplementárna nukleotídovej sekvencii uvedenej na Obrázku 1 (SEQ ID č.1) alebo SEQ ID č. 3. Takéto oligonukleotídy majú aspoň 10 nukleotídov, prednostne od zhruba 15 do zhruba 30 nukleotídov, a hybridizujú s jednou z vyššie uvedených polynukleotídových molekúl za vysoko prísnych podmienok to je premytie v 6 x

SSC/0,5% pyrofosfátu sodnom pri teplote zhruba 37°C pre oligonukleotídy so zhruba 14 bázami, pri teplote zhruba 48°C pre oligonukleotídy so zhruba 17 bázami, pri teplote zhruba 55°C pre oligonukleotídy so zhruba 20 bázami, a pri teplote zhruba 60°C pre oligonukleotídy so zhruba 23 bázami. V prednostnej forme vynálezu sú oligonukleotídy komplementárne k časti jednej z vyššie zmienených polynukleotídových molekúl. Tieto oligonukleotídy sú užitočné pre celý rad účelov vrátane kódovania alebo účinkovania ako antisensia molekuly pre reguláciu génov, alebo ako priméry pre amplifikáciu aveC alebo aveC homolog-kódujúcich polynukleotídových molekúl.

Ďalšie aveC homológne gény môžu byť identifikované v iných druhoch alebo kmeňoch *Streptomyces* za použitia polynukleotídových molekúl alebo oligonukleotídov uvedených tu v spojení so známymi technikami. Napríklad oligonukleotídová molekula obsahujúca časť *S. avermitilis* nukleotídovej sekvencie z Obrázku 1 (SEQ ID č.1), alebo časť *S. avermitilis* nukleotídovej sekvencie SEQ ID č.3 môže byť detekovateľne označená a použitá na vyhľadávanie genomickej knižnice konštruovanej z DNA odvodenej z organizmu, ktorý je predmetom záujmu. Prísnosť hybridizačných podmienok je zvolená na základe vzťahu referenčného organizmu, v tomto prípade *S. avermitilis* alebo *S. hygroscopicus*, k organizmu, ktorý je predmetom záujmu. Požiadavky na rôzne prísne podmienky sú dobre známe osobám skúseným v odbore, a tieto podmienky sa líšia v závislosti na špecifických organizmoch, z ktorých sú knižnice a označené sekvencie odvodené. Takéto oligonukleotídy majú prednostne aspoň zhruba 15 nukleotídov, napríklad sa jedná o oligonukleotídy opísané v príkladoch uskutočnenia vynálezu nižšie. Amplifikácia homológnych génov môže byť uskutočnená za použitia týchto aj iných oligonukleotídov použitím štandardných techník, ako je napríklad polymerázová

reťazová reakcia (PCR), aj keď môžu byť použité aj iné amplifikačné techniky známe v odbore.

Klony identifikované ako obsahujúce aveC homológne nukleotídové sekvencie môžu byť testované na schopnosť kódovať funkčný AveC homológny génový produkt. Na tento účel môžu byť klony podrobené sekvenčnej analýze za účelom identifikácie vhodného čítacieho rámca, rovnako tak ako iniciačných a terminačných signálov. Klonované DNA sekvencie môžu byť alternatívne alebo navyše inzerované do vhodného expresného vektora, to je do vektora, ktorý obsahuje potrebné elementy na transkripciu a transláciu inzerované proteín-kódujúcej sekvencie. Môže byť použitý ktorýkoľvek z celého radu hostiteľských/vektorových systémov, ako je opísané nižšie, ktoré zahŕňajú, ale nie sú obmedzené na bakteriálne systémy, ako sú napríklad plazmidové, baktériofágové alebo kozmidové expresné vektory. Príslušné hostiteľské bunky transformované takými vektormi zahŕňajúce potenciálne aveC homolog-kódujúce sekvencie môžu byť potom analyzované na aktivitu AveC za použitia spôsobov, ako je napríklad HPLC analýza fermentačných produktov, ako je opísané napríklad v časti 7 nižšie.

Produkcia a manipulácia polynukleotídových molekúl tu uvedených sú známe v odbore a môžu byť uskutočnené podľa rekombinantných techník opísaných napríklad v Maniatis et al., 1989, *Molecular Cloning, A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY; Ausubel et al., 1989, *Current Protocols In Molecular Biology*, Greene Publishing Associates and Wiley Interscience, NY; Sambrook et al., 1989, *Molecular Cloning, A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY; Innis et al. (eds), 1995, *PCR strategies*, Academic Press, Inc., San Diego; a Erlich (ed), 1992, *PCR Technology*, Oxford University Press,

New York, a tieto publikácie sú všetky do vynálezu začlenené ako referencie. Polynukleotídové klony kódujúce AveC génové produkty alebo AveC homológne génové produkty, môžu byť identifikované pomocou metód známych v odbore, ktoré zahŕňajú, ale nie sú obmedzené na spôsoby uvedené v časti 7 nižšie. Genomické knižnice môžu byť vyhľadávané na aveC a aveC homológne kódujúce sekvencie za použitia techník, ako sú napríklad metódy uvedené v publikácii Benton a Davis, 1977, Science 196:180 pre bakterifágové knižnice, a v publikácii Grunstein a Hodness, 1975, Proc Natl Acad sci USA, 72: 3961-3965 pre plazmidové knižnice. Polynukleotídové molekuly majúce nukleotídové sekvencie, o ktorých je známe, že zahŕňajú aveC ORF ako taký, napríklad v plazmide pSE186 (ATCC 209604) alebo v plazmide pSE119 (opísané v časti 7 nižšie), môžu byť použité ako próby v týchto vyhľadávacích experimentoch. Oligonukleotídové próby môžu byť syntetizované alternatívne tak, že korešpondujú s nukleotídovými sekvenciami odvodenými od čiastočných alebo úplných amínokyselinových sekvencií purifikovaného AveC homológneho génového produktu.

5.2 Rekombinantné systémy

5.2.1 Klonovacie a expresné vektory

Predkladaný vynález ďalej poskytuje rekombinantné klonovacie vektory a expresné vektory, ktoré sú užitočné na klonovanie alebo exprimovanie polynukleotídových molekúl, ktoré sú predmetom predkladaného vynálezu, napríklad aveC ORF *S. avermitilis* alebo ktorýchkoľvek aveC homológnych ORF. V nelimitujúcej forme poskytuje predkladaný vynález plazmid pSE186 (ATCC 209604), ktorý obsahuje kompletný ORF aveC gén *S. avermitilis*.

Všetky z nasledujúcich opisov týkajúcich sa aveC ORF z *S. avermitilis*, alebo polynukleotídovej molekuly obsahujúce aveC ORF z *S. avermitilis*, alebo jej časť, alebo *S. avermitilis* AveC génový produkt, sa tiež týkajú aveC homológov a AveC homológnych génových produktov, iba ak je výslovne alebo z kontextu uvedené inak.

Na špecifické použitie pre *Streptomyces* bol použitý celý rad rôznych vektorov, zahŕňajúcich medzi inými vektory fágové, plazmidy s vysokým počtom kópií, plazmidy s nízkym počtom kópií a *E.coli-Streptomyces* prenosové vektory, a ktorýkoľvek z nich môže byť použitý na uskutočnenie predkladaného vynálezu. zo *Streptomyces* bol tiež klonovaný celý rad génov pre liekovú rezistenciu a niektoré z týchto génov boli začlenené do vektorov ako vektory, ktoré je možné zvoliť. Príklady bežných vektorov na použitie v *Streptomyces* sú prezentované medzi inými miestami v publikácii Hutchinson 1980, *Applied Biochem Biotech* 16:169-190.

Rekombinantné vektory, ktoré sú predmetom predkladaného vynálezu, zvlášť expresné vektory, sú prednostne konštruované tak, že kódujúce sekvencie polynukleotídovej molekuly, ktorá je predmetom vynálezu, je v operačnom spojení s jedným alebo viacerými regulačnými elementami potrebnými na transkripciu a transláciu kódujúcej sekvencie za účelom produkcie polypeptídu. Ako je tu používané, termín "regulačný element" zahŕňa, ale nie je obmedzený na nukleotídové sekvencie, ktoré kódujú indukčibilné a neindukčibilné promotory, enhancery a ďalšie elementy známe v odbore, ktoré slúžia na reguláciu expresie polynukleotíd-kódujúcich sekvencií. Ako je tu tiež použité, je kódujúca sekvencia v "operačnom spojení" s jedným alebo viacerými regulačnými elementami, kde regulačné elementy

účinne regulujú a umožňujú transkripciu kódujúcej sekvencie alebo transláciu jeho mRNA, alebo oboje.

Typické plazmidové vektory, ktoré môžu byť pripravené, aby obsahovali medzi inými pCR-Blunt, pCR2.1 (Invitrogén), pGEM3Zf (Promega) a transportný vektor pWHM3 (Vara et al., 1989, J. Bact. 171:5872-5881).

Spôsoby na konštrukciu rekombinantných vektorov obsahujúce konkrétne kódujúce sekvencie v operačnom spojení s príslušnými regulačnými elementami sú dobre známe v odbore, a tieto spôsoby môžu byť použité na uskutočnenie predkladaného vynálezu. Tieto spôsoby zahŕňajú in vitro rekombinantné techniky, syntetické techniky a in vivo genetickú rekombináciu. Pozri napríklad techniky opísané v publikácii Maniatis et al., 1989, vyššie; Ausubel et al., 1989, vyššie; Sambrook et al., 1989, vyššie; Innis et al., 1995, vyššie; Erlich 1992, vyššie.

Ragulačné elementy týchto vektorov sa môžu líšiť vo svojej sile a vo svojich špecifitách. V závislosti na použítom hostiteľskom/vektorovom systéme môže byť použité akékoľvek množstvo vhodných transkripčných a translačných elementov. Neobmedzujúce príklady transkripčných regulačných oblastí alebo promotorov pre baktérie β -gal promotor, T7 promotor, TAC promotor, λ ľavý a pravý promotor, trp a lac promotory, trp-lac fúzne promotory a špecifickejšie pre Streptomyces, promotory ermE, melC a tipA, atď. V špecifickej forme opísanej v časti 11 nižšie bol generovaný expresný vektor, ktorý obsahuje klonovaný aveC ORF priľahle k silnému konštitutívnemu ermE promotoru zo Sacharopolyspora erytraea. Vektor bol transformovaný do S. avermitilis a následná HPLC analýza

fermentačných produktov ukázala zvýšený titer produkovaných avermektínov v porovnaní s produkciou rovnakého kmeňa, ktorý ale exprimuje divoký typ *aveC* alely.

Fúzne proteínové expresné vektory môžu byť použité na expresiu *AveC* génový produkt-fúzneho proteínu. Purifikovaný fúzny proteín môže byť použitý na získanie antiséra proti *AveC* génovému produktu, na štúdium biochemických vlastností *AveC* génového produktu, na prípravu *AveC* fúznych proteínov s odlišnými biochemickými aktivitami a na pomoc identifikovať alebo purifikovať exprimovaný *AveC* génový produkt. Možné expresné vektory pre fúzny proteín zahŕňajú, ale nie sú obmedzené na vektory inkorporujúcej sekvencie, ktoré kódujú β -galaktosidázu a *trpE* fúzy, maltózu viažúcu proteínové fúzy, glutation-S-tranferázové fúzy a polyhistidínové fúzy (nosičové oblasti). V alternatívnej forme vynálezu môžu byť *AveC* génový produkt alebo jeho časť sfúzované s *AveC* homológny génovým produktom alebo jeho časťou, odvodené od iných druhov alebo kmeňa *Streptomyces*, ako sú napríklad *S. hygroscopicus* alebo *S. griseochromogenes*. V konkrétnej forme vynálezu opísanej v časti 12 nižšie a zobrazenej na Obrázku 7 bol skonštruovaný chimérický plazmid, ktorý obsahuje 564 bp oblasť *S. avermitilis* *aveC* ORF. Takéto hybridné vektory môžu byť transformované do buniek *S. avermitilis* a testované za účelom určenia ich efektu napríklad na pomer triedy 2:1 produkovaných avermektínov.

AveC fúzne proteíny môžu byť pripravené, aby obsahovali oblasť užitočnú na purifikáciu. Fúznou *AveC*-maltózu viažúci proteín môže byť napríklad purifikovaný za použitia amylózovej živice; fúzne proteíny *AveC*-glutathion-S-transferáza môžu byť purifikované za použitia glutathion-agarózy; fúzne proteíny

AveC-polyhistidín môžu byť purifikované za použitia živice s bivalentným niklom. Na purifikáciu fúzneho proteínu afinitnou chromatografiou môžu byť alternatívne použité protilátky proti nosičovému proteínu alebo peptídu. Napríklad nukleotídová sekvencia kódujúca cieľový epitop monoklonálnej protilátky môže byť pripravená do expresného vektora v operačnom spojení s regulačnými elementami a situovaná tak, že exprimovaný epitop je sfúzovaný do AveC polypeptídu. Napríklad nukleotídová sekvencia kódujúca FLAGTM epitopovú návesť (International Biotechnologies Inc.), čo je hydrofilný markerový peptíd, môže byť inzertovaný štandardnými technikami do expresného vektora v bode zodpovedajúcom napríklad karboxylovému koncu AveC polypeptídu. Exprimovaný AveC polypeptíd-FLAGTM epitop fúzny produkt môže byť potom detekovaný a afinitne purifikovaný za použitia komerčne dostupných anti-FLAGTM protilátok.

Expresný faktor kódujúci AveC fúzny proteín môže byť tiež pripravený, aby obsahoval polyspájajúce sekvencie kódujúce špecifické proteázové štiepiace miesta tak, že exprimovaný AveC polypeptíd môže byť uvoľnený z nosičovej oblasti alebo z fúzneho partnera pomocou špecifickej proteázy. Fúzny proteínový vektor môže napríklad zahŕňať DNA sekvencie kódujúce medzi inými trombín alebo faktor Xa štiepiace miesta.

Signálna sekvencia hore od, a v čítacom rámci aveC ORF môže byť vpravená do expresného vektora známymi spôsobmi, aby sa usmernil smer a sekrécie exprimovaného génového produktu. Neobmedzujúce príklady signálnych sekvencií zahŕňajú medzi inými sekvencie α -faktora, imunoglobulínov, vonkajších membránových proteínov, penicilínázy a T bunkových receptorov.

Na pomoc pri výbere hostiteľských buniek transformovaných alebo transfektovaných klonovacími alebo expresnými vektormi, ktoré sú predmetom predkladaného vynálezu môže byť vektor pripravený tak, že ďalej obsahuje kódujúcu sekvenciu pre reportérový génový produkt alebo iný voliteľný marker. Taká kódujúca sekvencia je prednostne v operačnom spojení so sekvenciami kódujúcimi regulačný element, ako je opísané vyššie. Reportérové gény, ktoré sú užitočné vo vynáleze, sú dobre známe v odbore a zahŕňajú gény kódujúce medzi inými zelený fluórescenčný proteín luciferázu, xylE a tyrosinázu. Nukleotídové sekvencie kódujúce voliteľné markery sú dobre známe v odbore a zahŕňajú sekvencie, ktoré kódujú génové produkty udávajúce rezistenciu voči antibiotikám alebo antimetabolitom, alebo ktoré dodávajú auxotrofické požiadavky. Príklady takých sekvencií zahŕňajú sekvencie, ktoré kódujú rezistenciu medzi mnohými inými na erytromycín, tiosstreptón alebo kanamycín.

5.2.2 Transformácia hostiteľských buniek

Predkladaný vynález ďalej poskytuje transformované hostiteľské bunky obsahujúce polynukleotídovú molekulu alebo rekombinantný vektor, ktoré sú predmetom vynálezu, a nové kmene alebo bunkové línie od nich odvodené. Hostiteľské bunky užitočné na uskutočnenie vynálezu sú prednostne bunky *Streptomyces*, aj keď môžu byť použité aj iné prokaryotické alebo eukaryotické bunky. Takéto transformované hostiteľské bunky typicky zahŕňajú, ale nie sú obmedzené na mikroorganizmy, ako sú napríklad baktérie transformované medzi inými rekombinantnými bakteriofágovými DNA, plazmidovými DNA alebo kozmidovými DNA vektormi, alebo kvasnicami transformovanými rekombinantnými vektormi.

Polynukleotídové molekuly, ktoré sú predmetom predkladaného vynálezu, sú zamýšľané, aby fungovali pre bunky *Streptomyces*, ale môžu byť tiež transformované do iných bakteriálnych alebo eukaryotických buniek, napríklad na klonovacie alebo expresné účely. Môže byť typicky použitý kmeň *E. coli*, ako napríklad kmeň DH5 α , dostupný z Americkej zbierky typových kultúr (ATCC), Rockville, MD, USA) (prístupové číslo 31343) a z komerčných zdrojov (Stratagene). Prednostné hostiteľské bunky zahŕňajú kvasnicové bunky, aj keď môžu byť účinne použité aj savčie bunky alebo bunky hmyzu.

Rekombinantný expresný vektor, ktorý je predmetom vynálezu, je prednostne transformovaný alebo tranfektovaný do jednej alebo viacerých hostiteľských buniek alebo významne homogénnej kultúry buniek. Expresný vektor je všeobecne začlenený do hostiteľských buniek v zhode so známymi technikami, ako sú napríklad protoplastová transformácia, precipitácia kalcium fosfátom, reakcia s chloridom vápenatým, mikroinjikácia, elektroporácia, transfekcia kontaktom s rekombinovaným vírusom, transfekcia riadená lipozómom, transfekcia s DEAE dextranom, transdukcia, konjugácia alebo bombardovanie mikroprojektilmi. Voľba transformačných látok môže byť uskutočnená štandardnými postupmi, ako je napríklad pre bunky exprimujúci voliteľný marker voľba, napríklad antibiotické rezistencie združené s rekombinantným vektorom, ako je opísané vyššie.

Akonáhle je expresný vektor začlenený do hostiteľskej bunky, môže byť integrácia a udržanie *aveC* kódujúcej sekvencie, buď v chromozóme hostiteľskej bunky, alebo epizomálne, potvrdená štandardnými technikami, napríklad Southern hybridizačnou analýzou, restriktívnou enzýmovou

analýzou, PCR analýzou zahŕňajúcou PCR s reverznou transkriptázou (rt-PCR), alebo imunologickou analýzou za účelom detekcie očakávaného génového produktu. Hostiteľské bunky obsahujúce a/alebo exprimujúce rekombinantnú aveC kódujúcu sekvenciu, môžu byť identifikované ktorýmkoľvek z aspoň štyroch všeobecných prístupov, ktoré sú dobre známe v odbore, ktoré zahŕňajú: i) DNA-DNA, DNA-RNA, alebo RNA-antisense RNA hybridizáciu; ii) detekciu prítomnosti funkčnosti "markerového" génu; iii) posúdenie stupňa transkripcie meraním exprese aveC-špecifických mRNA transkriptov v hostiteľskej bunke; a iv) detekciu prítomnosti zrelého polypeptidového produktu napríklad imunoanalýzou alebo prítomnosťou AveC biologickej aktivity (ako je napríklad produkcia alebo špecifické pomery a množstvá avermektínov ukazujúce na AveC aktivitu v napríklad *S. avermitilis* hostiteľských bunkách).

5.2.3 Expresia a charakterizácia rekombinantného AveC génového produktu

Akonáhle bola stabilne vložená do príslušnej hostiteľskej bunky aveC kódujúcej sekvencie, je transformovaná hostiteľská bunka klonovo propagovaná, a výsledné bunky môžu rásť za podmienok napomáhajúcich maximálnej produkcii AveC génového produktu. Takéto podmienky typicky zahŕňajú rastúce bunky do vysokej hustoty. Kde expresný vektor obsahuje induktibilný promotor, sú použité príslušné indukčné podmienky, ako sú napríklad teplotný posun, deplécia živín, prídanie bezdôvodných induktérov (ako sú napríklad analógy karbohydrátov, ako napríklad izopropyl- β -D-tiogalaktopyranosidu (IPTG)), akumulácia nadbytku

metabolických vedľajších produktov, alebo podobne, ako je požadované na indukovanie expresie.

Kde je exprimovaný AveC génový produkt zadržaný vo vnútri hostiteľských buniek, sú tieto bunky zbierané a zlýzované, a produkt je izolovaný a purifikovaný z lyzátu za extrakčných podmienok známych v odbore, aby sa minimalizovala degradácia bielkovín, ako sú napríklad teplota 4°C alebo prítomnosť inhibítorov proteáz, alebo oboje. Kde je exprimovaný AveC génový produkt sekretovaný z hostiteľských buniek, môže byť vyčerpané živné médium jednoducho zbrané a produkt z neho môže byť izolovaný.

Exprimovaný AveC génový produkt môže byť izolovaný alebo významne purifikovaný podľa vhodnosti z bunkových lyzátoch alebo kultivačného média za použitia štandardných spôsobov zahŕňajúcich, ale neobmedzujúcich sa na ktorúkoľvek kombináciu z nasledujúcich spôsobov: amonsulfátová precipitácia, frakcionácia podľa veľkosti, ionexová chromatografia, HPLC, hustotná centrifugácia a afinitná chromatografia. Kde exprimovaný AveC génový produkt vykazuje biologickú aktivitu, môže byť zvyšujúca sa čistota preparátu monitorovaná v každom kroku purifikačného postupu použitím ktorejkoľvek vhodnej analýzy. Či už exprimovaný AveC génový produkt vykazuje biologickú aktivitu alebo nie, môže byť detekovaný na základe napríklad veľkosti, alebo reaktivity s protilátkou inak špecifickou pre AveC, alebo pomocou prítomnosti fúznej návesti. Ako je tu používané, je AveC génový produkt "významne purifikovaný" tam, kde produkt konštituuje viac ako 20 váhových % bielkoviny v konkrétnom preparáte. Ako je tu tiež používané, je AveC génový produkt "izolovaný", kde tento produkt konštituuje aspoň 80 váhových % bielkoviny v konkrétnom preparáte.

Predkladaný vynález teda poskytuje rekombinantne-exprimovaný izolovaný alebo významne purifikovaný *S. avermitilis* AveC génový produkt obsahujúci amínokyselinovú sekvenciu kódovanú AveC génový produkt-kódujúcou sekvenciou plazmidu pSE186 (ATCC 209604), alebo amínokyselinovou sekvenciou z Obrázku 1 (SEQ ID č. 2), alebo jej významnú časť a jej homológy.

Predkladaný vynález ďalej poskytuje rekombinantne-exprimovaný izolovaný alebo významne purifikovaný *S. hygroscopicus* AveC homológny génový produkt obsahujúci amínokyselinovú sekvenciu SEQ ID č. 4, alebo jej významnú časť a jej homológy.

Predkladaný vynález ďalej poskytuje spôsob produkcie AveC génového produktu zahŕňajúci kultiváciu hostiteľskej bunky transformovanej rekombinantným expresným vektorom, kde zmienený vektor zahŕňa polynukleotídovú molekulu majúcu nukleotídovú sekvenciu kódujúcu AveC génový produkt, a táto polynukleotídová molekula je v operačnom spojení s jedným alebo viacerými regulačnými elementami, ktoré kontrolujú expresiu polynukleotídovej molekuly v hostiteľskej bunke za podmienok napomáhajúcich produkcii rekombinantného AveC génového produktu a získanie AveC génového produktu z bunkovej kultúry.

Rekombinantne exprimovaný *S. avermitilis* AveC génový produkt je užitočný pre celý rad účelov zahŕňajúcich vyhladávanie zlúčenín, ktoré narušujú funkciu AveC génového produktu a tým modulujú biosyntézu avermektínov, a ďalej získavanie protilátok namierených proti AveC génovému produktu.

Akonáhle je AveC génový produkt s dostatočnou čistotou získaný, môže byť charakterizovaný štandardnými spôsobmi zahŕňajúcimi SDS-PAGE, chromatografiu na základe separácie podľa veľkosti, amínokyselinovú sekvenčnú analýzu, biologickú aktivitu v produkujúcich príslušných produktoch v biosyntetickej dráhe avermektínov, atď. Amínokyselinová sekvencia AveC génového produktu môže byť napríklad určená za použitia štandardných sekvenčných techník pre peptídy. AveC génový produkt môže byť ďalej charakterizovaný za použitia analýzy hydrofilít (pozri napríklad Hopp a Woods, 1981, Proc. Nat. Acad. Sci. USA 78:3824), alebo analogickým softwarovým algoritmom za účelom identifikácie hydrofóbných a hydrofilných oblastí AveC génového produktu. Štrukturálna analýza môže byť uskutočnená za účelom identifikácie oblastí AveC génového produktu, ktoré sú zodpovedné za sekundárnu štruktúru. Na mapovanie a štúdium miest interakcií medzi AveC génovým produktom a jeho substrátom môžu byť použité biofyzikálne metódy, ako sú napríklad röntgenová kryštalografia (Engstrom, 1974, Biochem Exp Biol 11:7-13) počítačové modelovanie (Fletterick a Zoller (eds), 1986, v: Current Communications in Molecular Biology, Cold Springs Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY) a nukleárna magnetická rezonancia (NMR). Informácie získané z týchto štúdií môžu byť použité na vybranie nových miest pre mutácie v aveC ORF, aby sa pomohlo vyvinúť nové kmene *S. avermitilis* majúce viac žiadúce charakteristiky produkcie avermektínov.

5.3 Konštrukcia a použitie AveC mutantov

Predkladaný vynález poskytuje polynukleotídovú molekulu obsahujúcu nukleotídovú sekvenciu, ktorá je inak rovnaká ako *S. avermitilis* aveC alela alebo jej degeneračný variant, alebo

AveC génový produkt-kódujúca sekvencia plazmidu pSE186 (ATCC 209604), alebo jej degeneračný variant, alebo nukleotídová sekvencia aveC ORF *S. avermitilis*, ako je prezentované na Obrázku 1 (SEQ ID č. 1), alebo jej degeneračný variant, alebo ktoré ďalej obsahujú jednu alebo viacej mutácií, takže bunky kmeňa *S. avermitilis* ATCC 53692, v ktorých bol divoký typ aveC alely inaktivovaný, a ktorý exprimuje polynukleotídovú molekulu obsahujúcu mutovanú nukleotídovú sekvenciu, alebo jej degeneračný variant, produkujú odlišný pomer alebo množstvo avermektínov, ktoré sú produkované bunkami kmeňa *S. avermitilis* ATCC 53692, ktoré exprimujú len divoký typ aveC alely.

Podľa predkladaného vynálezu môžu byť takéto polynukleotídové molekuly použité na produkciu nových kmeňov *S. avermitilis*, ktoré vykazujú detekovateľnú zmenu v produkcii avermektínov v porovnaní s rovnakým kmeňom, ktorý exprimuje len divoký typ aveC alely. V prednostnej forme vynálezu sú takéto polynukleotídové molekuly užitočné na produkciu nových kmeňov *S. avermitilis*, ktoré produkujú avermektíny v zníženom pomere triedy 2:1 v porovnaní s rovnakým kmeňom, ktorý exprimuje len divoký typ aveC alely. V ďalšej prednostnej forme sú takéto polynukleotídové molekuly užitočné na produkciu nových kmeňov *S. avermitilis*, ktoré produkujú zvýšené množstvá avermektínov v porovnaní s rovnakým kmeňom, ktorý exprimuje len jediný divoký typ aveC alely. V ďalšej prednostnej forme sú takéto polynukleotídové molekuly užitočné na produkciu nových kmeňov *S. avermitilis*, v ktorých je aveC gén inaktivovaný.

Mutácie aveC alely alebo kódujúcej sekvencie ktorejkoľvek mutácie, ktoré vedú na jednu alebo viacej delécií, adícií alebo substitúcií do AveC génového produktu, alebo ktoré vedú

na vznik znetvoreného AveC génového produktu, alebo na akúkoľvek ich kombináciu, a ktoré vedú na požadovaný výsledok. Takéto mutované sekvencie aveC alely sú tiež zamýšľané, aby obsahovali ich degenerované varianty. Predkladaný vynález napríklad poskytuje polynukleotídové molekuly obsahujúce nukleotídovú sekvenciu aveC alely alebo jej degenerované varianty, alebo AveC génový produkt-kódujúcu sekvenciu plazmidu pSE186 (ATCC 209604), alebo jej degenerovaný variant, alebo nukleotídovú sekvenciu aveC ORF S. avermitilis, ako je uvedené na Obrázku 1 (SEQ ID č. 1), alebo jej degenerovaný variant, ale ktoré ďalej obsahujú jednu alebo viacej mutácií, ktoré kódujú substitúciu amínokyselinového rezídua odlišným amínokyselinovým rezíduom v zvolených pozíciách v AveC génovom produkte. V niekoľkých neobmedzujúcich formách vynálezu, z ktorých niekoľko je uvedených príkladom nižšie, môžu byť takéto substitúcie uskutočnené v ktorýchkoľvek amínokyselinových pozíciách AveC génového produktu, ktoré korešpondujú s amínokyselinovými pozíciami 38, 48, 55, 89, 99, 111, 136, 138, 139, 154, 179, 228, 230, 238, 266, 275, 289 alebo 298 sekvencie SEQ ID č. 2, alebo niektorými ich kombináciami.

Mutácie aveC kódujúcej sekvencie sú uskutočnené ktoroukoľvek zo známych metód zahŕňajúcich použitie PCR náchylné na chyby, alebo kazetovej mutagenézie. Na narušenie sekvencie aveC alely alebo ORF definovaným spôsobom, napríklad vložením jedného alebo viacerých restričných miest, alebo terminačného kodónu, do špecifických oblastí v aveC alele alebo ORF môže byť napríklad použitá mutagenézia riadená oligonukleotídom. Na tvorbu veľkých knižníc polynukleotídov majúcich nukleotídové sekvencie kódujúce aveC mutácie môžu byť tiež použité metódy napríklad opísané v patentoch US Patent 5605793, US Patnt 5830721 a US Patent 5837458, ktoré zahŕňajú

náhodnú fragmentáciu, opakované cykly mutagenézie a nukleotídové premiestňovanie.

Užitočné môžu byť cielené mutácie, obzvlášť tam, kde slúžia na narušenie jedného alebo viacerých konzervovaných amínokyselinových rezíduí v AveC génovom produkte. Napríklad porovnanie odvodených amínokyselinových sekvencií AveC génových produktov a AveC homológnych génových produktov zo *S. avermitilis* (SEQ ID č. 2), *S. griseochromogenes* (SEQ ID č. 5) a *S. hygroscopicus* (SEQ ID č. 4), ako sú uvedené na Obrázku 6, ukazuje miesta významnej konzervácie amínokyselinových rezíduí medzi týmito druhmi. V tvorbe nových mutovaných kmeňov, ktoré vykazujú požadované alterácie produkcia avermektínov môže byť obzvlášť účinná cielená mutagenézia, ktorá vedie na zmenu v jednom alebo viacerých týchto konzervovaných amínokyselinových rezíduách.

Užitočná môže byť tiež náhodná mutagenézia, ktorá môže byť uskutočnená expozíciou buniek *S. avermitilis* ultrafialovému žiareniu alebo röntgenovému žiareniu, alebo chemickým mutagénom, ako sú napríklad N-metyl-N'-nitrosoguanidín, etyl metan sulfonát, kyselina dusičná alebo nitrogén mustard. Na zhrnutie techník mutagenézie pozri napríklad Ausubel, 1989 vyššie.

Akonáhle sú mutované polynukleotídové sekvencie generované, kontrolujú sa, aby sa určilo, či môžu modulovať biosyntézu avermektínov v *S. avermitilis*. V prednostnej forme vynálezu je polnukleotídová molekula majúca mutovanú nukleotídovú sekvenciu testovaná komplementáciou kmeňa *S. avermitilis*, v ktorom bol *aveC* gén inaktivovaný za vzniku *aveC* negatívneho (*aveC*⁻) pozadia. V neobmedzujúcom spôsobe je mutovaná polynukleotídová molekula zostrihaná do expresného

plazmidu v operačnom spojení s jedným alebo viacerými regulačnými elementami, a tento plazmid tiež prednostne obsahuje jeden alebo viacej génov na liekovú rezistenciu, ktoré umožňujú výber transformovaných buniek. Tento vektor je potom transformovaný do aveC hostiteľských buniek pomocou známych techník a transformované bunky sú vybrané a kultivované v príslušnom fermentačnom médiu za podmienok, ktoré umožňujú alebo indukujú produkciu avermektínov. Fermentačné produkty sú potom analyzované pomocou HPLC, aby sa určila schopnosť mutovanej polynukleotídovej molekuly na komplementáciu hostiteľskej bunky. Niektoré vektory nesúce mutované polynukleotídové molekuly schopné znížiť B2:B1 pomer avermektínov zahŕňajúce pSE 188, pSE 199, pSE 231, pSE 239 a pSE 290 až pSE 297, ako je uvedené príkladom v časti 8,3 nižšie.

Predkladný vynález poskytuje spôsoby identifikácie mutácií *S. avermitilis* aveC ORF schopných narušiť pomer a/alebo množstvo produkovaných avermektínov. V prednostnej forme poskytuje predkladný vynález spôsob identifikácie mutácií schopných narušiť pomer triedy 2:1 produkovaných avermektínov, a tento spôsob zahŕňa (a) určenie pomeru triedy 2:1 avermektínov produkovaných bunkami kmeňa *S. avermitilis*, v ktorých bola natívna aveC alela inaktivovaná, a do ktorých bola vložená polynukleotídová molekula obsahujúca nukleotídovú sekvenciu kódujúcu mutovaný AveC génový produkt, a táto molekula je exprimovaná; (b) určenie pomeru triedy 2:1 avermektínov produkovaných bunkami rovnakého kmeňa *S. avermitilis* ako v kroku (a), ale tieto bunky miesto toho exprimujú len divoký typ aveC alely alebo ORF z Obrázku 1 (SEQ ID č. 1), alebo nukleotídovú sekvenciu, ktorá je k ORF homológna; a (c) porovnanie pomeru triedy 2:1 avermektínov produkovaných bunkami *S. avermitilis* z kroku (a) s pomerom

triedy 2:1 avermektínov produkovaných bunkami *S. avermitilis* z kroku (b); takže keď je pomer triedy 2:1 avermektínov produkovaných bunkami *S. avermitilis* z kroku (a) odlišný od pomeru triedy 2:1 avermektínov produkovaných bunkami *S. avermitilis* z kroku (b), potom môže byť identifikovaná mutácia *aveC* ORF schopná zmeniť pomer triedy 2:1 avermektínov. V prednostnej forme vynálezu je pomer triedy 2:1 avermektínov touto mutáciou znížený.

V ďalšej prednostnej forme poskytuje predkladaný vynález spôsob identifikácie mutácií *aveC* ORF alebo genetických konštruktov obsahujúcich *aveC* ORF schopné zmeniť množstvo produkovaných avermektínov, a tento spôsob zahŕňa: (a) určenie množstva avermektínov produkovaných bunkami kmeňa *S. avermitilis*, v ktorých bola natívna *aveC* alela inaktivovaná, a do ktorých bola vložená polynukleotídová molekula obsahujúca nukleotídovú sekvenciu kódujúcu mutovaný *AveC* génový produkt, alebo obsahujúcu genetický konštrukt zahŕňajúci nukleotídovú sekvenciu kódujúcu *AveC* génový produkt a táto molekula je exprimovaná; (b) určenie množstva avermektínov produkovaných rovnakým kmeňom *S. avermitilis* ako v kroku (a), ale tento kmeň miesto toho exprimuje len divoký typ *aveC* alely alebo homológnu nukleotídovú sekvenciu; a (c) porovnanie množstva avermektínov produkovaných bunkami *S. avermitilis* z kroku (a) s množstvom avermektínov produkovaných bunkami *S. avermitilis* z kroku (b); takže keď je množstvo avermektínov produkovaných bunkami *S. avermitilis* z kroku (a) odlišné od množstva avermektínov produkovaných bunkami *S. avermitilis* z kroku (b), potom môže byť identifikovaná mutácia *aveC* ORF alebo genetického konštraktu schopná zmeniť pomer triedy 2:1 avermektínov. V prednostnej forme vynálezu je produkované množstvo avermektínov touto mutáciou zvýšené.

Ktorýkoľvek z vyššie uvedených spôsobov na identifikáciu mutácií môže byť uskutočnený za použitia fermentačného kultivačného média prednostne suplementovaného cyklohexan karboxylovou kyselinou, aj keď môžu byť použité aj iné vhodné prekurzory mastných kyselín, ako sú napríklad ktorékoľvek prekurzory mastných kyselín uvedených v tabuľke 1.

Akonáhle je identifikovaná mutovaná polynukleotídová molekula, ktorá moduluje produkciu avermektínov žiadúcim smerom, môže byť určené umiestnenie mutácie v nukleotídovej sekvencii. Polynukleotídová molekula majúca nukleotídovú sekvenciu kódujúcu mutovaný AveC génový produkt môže byť napríklad izolovaná pomocou PCR a podrobená DNA sekvenčnej analýze za použitia známych spôsobov. Mutácia(e) zodpovedná(é) za alteráciu produkcie avermektínov môže byť určená porovnaním DNA sekvencie mutovanej aveC alely so sekvenciou divokého typu aveC alely. V špecifických, ale neobmedzujúcich formách predkladaného vynálezu viedli *S. avermitilis* AveC génové produkty obsahujúce buď jedinú amínokyselinovú substitúciu v ktoromkoľvek z rezíduí 55 (S55F), 138 (S138T), 139 (A139T), alebo 230 (G230D), alebo dve substitúcie v pozíciách 138 (S138T) a 139 (A139T alebo A139F) na zmeny vo funkcii AveC génového produktu, takže pomer triedy 2:1 produkovaných avermektínov bol narušený (pozri Časť 8 nižšie), kde uvedené amínokyselinové pozície korešpondujú s pozíciami na Obrázku 1 (SEQ ID č.2). Navyše bolo preukázané, že nasledujúcich sedem kombinácií mutácií účinne znižuje pomer triedy 2:1 avermektínov: 1) D48E; 2) S138T/A139T/G179S; 3) Q38P/L136P/E238D; 4) F99S/S138T/A139T/G179S; 5) A139T/M228T; 6) G111V/P289T. Ako je tu používané, vyššie uvedené označenia, ako napríklad A139T, ukazujú pôvodné amínokyselinové rezídium jednopísmenovým označením, v ktorom je v tomto prípade alanín (A) v uvedenej pozícii, ktorá je v tomto prípade pozícia 139

(týka sa SEQ ID č.2) polypeptídu, a nasleduje amínokyselinové rezídium, ktoré nahradzuje pôvodné amínokyselinové rezídium, ktorým je v tomto prípade treonín (T). Z tohto dôvodu sú polynukleotídové sekvencie majúce nukleotídové sekvencie, ktoré kódujú mutované *S. avermitilis* génové produkty obsahujúce amínokyselinové substitúcie alebo delécie v jednej alebo viacerých amínokyselinových pozíciách 38, 48, 55, 89, 99, 111, 136, 138, 139, 154, 179, 228, 230, 238, 266, 275, 289, alebo 298 (pozri Obrázok 1), alebo ktorékoľvek ich kombinácie, zahrnuté predkladaným vynálezom.

V prednostnej forme vynálezu kódujú takéto mutácie amínokyselinové substitúcie vybrané z jednej alebo viacerých skupín obsahujúcich:

- a) amínokyselinové rezídium Q v pozícii 38 nahradené P alebo amínokyselinou, ktorá je konzervatívnou substitúciou pre P;
- b) amínokyselinové rezídium D v pozícii 48 nahradené E alebo amínokyselinou, ktorá je konzervatívnou substitúciou pre E;
- c) amínokyselinové rezídium A v pozícii 89 nahradené T alebo amínokyselinou, ktorá je konzervatívnou substitúciou pre T;
- d) amínokyselinové rezídium F v pozícii 99 nahradené S alebo amínokyselinou, ktorá je konzervatívnou substitúciou pre S;
- e) amínokyselinové rezídium G v pozícii 111 nahradené V alebo amínokyselinou, ktorá je konzervatívnou substitúciou pre V;
- f) amínokyselinové rezídium L v pozícii 136 nahradené P alebo amínokyselinou, ktorá je konzervatívnou substitúciou pre P;

- g) amínokyselinové rezíduum S v pozícii 138 nahradené T alebo amínokyselinou, ktorá je konzervatívnou substitúciou pre T;
- h) amínokyselinové rezíduum A v pozícii 139 nahradené T alebo F alebo amínokyselinou, ktorá je konzervatívnou substitúciou pre T alebo F;
- i) amínokyselinové rezíduum K v pozícii 154 nahradené E alebo amínokyselinou, ktorá je konzervatívnou substitúciou pre E;
- j) amínokyselinové rezíduum G v pozícii 179 nahradené S alebo amínokyselinou, ktorá je konzervatívnou substitúciou pre S;
- k) amínokyselinové rezíduum M v pozícii 228 nahradené T alebo amínokyselinou, ktorá je konzervatívnou substitúciou pre T;
- l) amínokyselinové rezíduum E v pozícii 238 nahradené D alebo amínokyselinou, ktorá je konzervatívnou substitúciou pre D;
- m) amínokyselinové rezíduum P v pozícii 289 nahradené L alebo amínokyselinou, ktorá je konzervatívnou substitúciou pre L; a
- n) amínokyselinové rezíduum Q v pozícii 298 nahradené H alebo amínokyselinou, ktorá je konzervatívnou substitúciou pre H;

kde konzervatívne amínokyselinové substitúcie sú rovnaké, ako je definované vyššie.

V ďalšej prednostnej forme vynálezu kódujú takéto mutácie kombináciu amínokyselinových substitúcií, kde kombinácia substituovaných amínokyselinových rezíduí je vybraná zo skupiny obsahujúcej:

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

V ďalšej prednostnej forme vynálezu sú špecifické kombinácie mutácií aveC alely užitočné na efektívne zníženie pomeru triedy 2:1 avermektínov podľa predkladaného vynálezu vybrané z jednej alebo viacerých skupín obsahujúcich:

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

Predkladaný vynález ďalej poskytuje preparáty na prípravu nových kmeňov *S. avermitilis*, ktorých bunky obsahujú mutovanú aveC alelu, ktorá vedie na narušenie produkcie avermektínov. Predkladaný vynález napríklad poskytuje rekombinantné vektory, ktoré môžu byť použité na zacielenie akejkoľvek polynukleotídovej molekuly obsahujúcej mutované nukleotídové sekvencie, ktoré sú predmetom predkladaného vynálezu na miesto aveC génu chromozómu *S. avermitilis* buď na inzerciu alebo na nahradenie aveC ORF alebo jeho časti pomocou homológnej rekombinácie. Podľa predkladaného vynálezu ale môže

polynukleotídová molekula obsahujúca tu poskytnutú mutovanú nukleotídovú sekvenciu, ktorá je predmetom predkladaného vynálezu, tiež modulovať biosyntézu avermektínov, keď je inzerovaná do chromozómu v mieste inom ako je aveC gén, alebo keď je udržiavaná epizomálne v bunkách *S. avermitilis*. Predkladaný vynález teda tiež poskytuje vektory obsahujúce polynukleotídovú molekulu obsahujúcu mutovanú nukleotídovú sekvenciu, ktorá je predmetom predkladaného vynálezu, a tieto môžu byť použité na inzerciu polynukleotídovej molekuly na miesto v chromozóme *S. avermitilis* inej ako je aveC gén, alebo môžu byť udržiavané epizomálne.

V prednostnej forme poskytuje predkladaný vynález vektory na náhradu génov, ktoré môžu byť použité na inzerciu mutovanej aveC alely alebo jej degenerovaného variantu do buniek kmeňa *S. avermitilis*, čím dochádza na tvorbu nových kmeňov *S. avermitilis*, ktorých bunky produkujú avermektíny v narušenom pomere triedy 2:1 v porovnaní s bunkami rovnakého kmeňa, ktorý miesto toho exprimuje len divoký typ aveC alely. V prednostnej forme je pomer triedy 2:1 avermektínov produkovaných bunkami znížený. Takéto vektory nahradzujúce gény môžu byť konštruované za použitia mutovaných polynukleotídových molekúl prítomných v tu poskytnutých expresných vektoroch, ako sú napríklad pSE188, pSE199 a pSE231, a tieto expresné vektory sú uvedené príkladom v časti 8 nižšie.

V ďalšej prednostnej forme poskytuje predkladaný vynález vektory, ktoré môžu byť použité na inzerciu mutovanej aveC alely alebo jej degenerovaného variantu do buniek kmeňa *S. avermitilis* na tvorbu nových kmeňov buniek, ktoré produkujú avermektíny v narušenom množstve v porovnaní s bunkami rovnakého kmeňa, ktorý miesto toho exprimuje len divoký typ

aveC alely. V prednostnej forme je množstvo avermektínov produkovaných bunkami zvýšené. V špecifickej, ale neobmedzujúcej forme vynálezu zahŕňa taký vektor silný promotor, ako je známy v odbore, ako je napríklad silný konštitutívny ermE promotor z *Sacharopolysora erythraea*, ktorý je situovaný v smere hore od a v operačnom spojení s aveC alelou. Takým vektorom môže byť pSE189, opísaný v príklade uskutočnenia vynálezu 11 nižšie, alebo môže byť konštruovaný za použitia mutovanej aveC alely plazmidu pSE189.

V ďalšej prednostnej forme poskytuje predkladaný vynález vektory na náhradu génov, ktoré sú užitočné na inaktiváciu aveC génu divokého typu kmeňa *S. avermitilis*. V neobmedzujúcej forme vynálezu môžu byť takéto vektory nahradzujúce gén skonštruované za použitia mutovanej polynukleotídovej molekuly prítomnej v plazmide pSE180 (ATCC 209605), ktorá je uvedená príkladom v časti 8.1 nižšie (Obrázok 3). V ďalšej prednostnej forme poskytuje predkladaný vynález vektory na náhradu génov, ktoré zahŕňajú polynukleotídovú molekulu obsahujúcu alebo skladajúcu sa z nukleotídových sekvencií, ktoré prirodzene hraničia s aveC génom in situ v chromozóme *S. avermitilis*, a zahŕňajú napríklad hraničiace nukleotídové sekvencie uvedené na Obrázku 1 (SEQ ID č.1), a tieto vektory môžu byť použité na vymazanie *S. avermitilis* aveC ORF.

Predkladaný vynález ďalej poskytuje spôsoby na prípravu nových kmeňov *S. avermitilis* zahŕňajúci bunky, ktoré exprimujú mutovanú aveC alelu, a ktoré produkujú porušený pomer a/alebo množstvo avermektínov v porovnaní s bunkami rovnakého kmeňa *S. avermitilis*, ktoré exprimujú len divoký typ aveC alely. V prednostnej forme poskytuje predkladaný vynález spôsob na prípravu nových kmeňov *S. avermitilis* zahŕňajúci bunky, ktoré exprimujú mutovanú aveC alelu, a ktoré produkujú porušený

pomer triedy 2:1 avermektínov v porovnaní s bunkami rovnakého kmeňa *S. avermitilis*, ktoré exprimujú len divoký typ *aveC* alely, ďalej zahŕňajúci transformujúce sa bunky kmeňa *S. avermitilis* s vektorom, ktorý nesie mutovanú *aveC* alelu kódujúcu génový produkt, ktorý narušuje pomer triedy 2:1 avermektínov produkovaných bunkami kmeňa *S. avermitilis* exprimujúcimi mutovanú *aveC* alelu v porovnaní s bunkami rovnakého kmeňa *S. avermitilis*, ktoré exprimujú len divoký typ *aveC* alely, a vybranie transformovaných buniek, ktoré produkujú narušený pomer triedy 2:1 v porovnaní s pomerom triedy 2:1 produkovaným bunkami kmeňa, ktorý exprimuje len divoký typ *aveC* alely. V prednostnejšej forme poskytuje predkladaný vynález spôsob na prípravu nového kmeňa *S. avermitilis* zahŕňajúci transformujúce sa bunky kmeňa *S. avermitilis* s vektorom schopným vytvoriť mutáciu v *aveC* alele takých buniek, kde mutácia *aveC* alely vedie na substitúciu v kódovanom *AveC* génovom produkte rôzneho amínokyselinového rezídua v jednej alebo viacerých amínokyselinových pozíciách zodpovedajúcich amínokyselinovým rezíduám 38, 48, 55, 89, 99, 111, 136, 138, 139, 154, 179, 228, 230, 238, 266, 275, 289, alebo 298 so sekvenciou SEQ ID č.2, takže bunky kmeňa *S. avermitilis*, v ktorých bola *aveC* alela mutovaná, produkujú pomer triedy 2:1, ktorý je odlišný od pomeru produkovaného bunkami rovnakého kmeňa *S. avermitilis*, ktoré exprimujú len divoký typ *aveC* alely. V prednostnej forme vynálezu je znížený pomer triedy 2:1 avermektínov.

Ako je tu používané, tam, kde amínokyselinové rezídium kódované *aveC* alelou v chromozóme *S. avermitilis*, alebo vo vektore alebo izolovanej polynukleotídovej molekule, ktorá je predmetom predkladaného vynálezu je označené ako "zodpovedajúce" konkrétnemu amínokyselinovému rezídiu so sekvenciou SEQ ID č.2, alebo kde je amínokyselinová

substitúcia označená ako vyskytujúca sa v konkrétnej pozícii "zodpovedajúcej" špecifickému očíslovanému amínokyselinovému rezíduu so sekvenciou SEQ ID č.2, týka sa amínokyselinové rezídum rovnakého relatívneho umiestnenia v AveC génomom produkte, ktorý osoba pohybujúca sa v obore môže rýchlo určiť pomocou odkazu na amínokyselinovú sekvenciu tu prezentovanú ako SEQ ID č.2.

Predkladaný vynález ďalej poskytuje spôsoby na prípravu nových kmeňov, kde špecifické mutácie v aveC alele kódujúce konkrétne mutácie sú uvádzané ako základné zmeny v špecifických nukleotídových pozíciách v aveC alele "zodpovedajúcej" konkrétnym nukleotídovým pozíciám, ako je uvedené v sekvencii SEQ ID č. 1. Ako je uvedené vyššie, s ohľadom na zodpovedajúce amínokyselinové pozície, kde je nukleotídová pozícia v aveC alele uvádzaná ako "zodpovedajúca" konkrétnej nukleotídovej pozícii v sekvencii SEQ ID č. 1, týka sa nukleotíd rovnakého relatívneho umiestnenia v aveC nukleotídovej sekvencii, ktorú môže osoba pohybujúca sa v obore rýchlo určiť pomocou odkazu na nukleotídovú sekvenciu tu prezentovanú ako sekvencia SEQ ID č.1.

V ďalšej prednostnej forme poskytuje predkladaný vynález spôsob na prípravu nových kmeňov *S. avermitilis* zahŕňajúci bunky, ktoré produkujú porušené množstvá avermektínov, zahŕňajúce transformujúce sa bunky kmeňa *S. avermitilis* s vektorom, ktorý nesie mutovanú aveC alelu alebo genetický konštrukt obsahujúci aveC alelu, ktorej expresia vedie na narušenie množstva avermektínov produkovaných bunkami kmeňa *S. avermitilis* exprimujúcimi mutovanú aveC alelu alebo genetický konštrukt v porovnaní s bunkami rovnakého kmeňa, ktoré exprimujú len divoký typ aveC alely, a vybranie transformovaných buniek, ktoré produkujú avermektíny v

narušenom množstve v porovnaní s množstvom avermektínov produkovaným bunkami kmeňa, ktorý exprimuje len divoký typ aveC alely. V prednostnej forme vynálezu je zvýšené množstvo avermektínov produkovaných transformovanými bunkami.

V ďalšej prednostnej forme poskytuje predkladaný vynález spôsob na prípravu nových kmeňov *S. avermitilis*, ktorých bunky obsahujú inaktivovanú aveC alelu, zahŕňajúci transformujúce sa bunky kmeňa *S. avermitilis*, ktoré exprimujú ktorúkoľvek aveC alelu s vektorom, ktorý inaktivuje aveC alelu, a vybranie transformovaných buniek, v ktorých bola aveC alela inaktivovaná. V prednostnejšej, ale neobmedzujúcej forme vynálezu sú bunky kmeňa *S. avermitilis* transformované vektorom nahrazujúcim gén, ktorý nesie aveC alelu, ktorá bola inaktivovaná mutáciou alebo náhradou časti aveC alely heterolognou génovou sekvenciou, a sú vybrané transformované bunky, v ktorých bola inak natívna aveC alela nahradená inaktivovanou aveC alelou. Inaktivácia aveC alely môže byť určená HPLC analýzou fermentačných produktov, ako je opísané nižšie. V špecifickej, ale neobmedzujúcej forme vynálezu opísanej v časti 8.1 nižšie bola aveC alela inaktivovaná inzerciou *ermE* génu zo *Sacharopolyspora erythraea* do aveC ORF.

Predkladaný vynález ďalej poskytuje nové kmene *S. avermitilis* zahŕňajúce bunky, ktoré boli transformované ktorýmkoľvek polynukleotídovými molekulami alebo vektormi, ktoré sú predmetom predkladaného vynálezu. V prednostnej forme poskytuje predkladaný vynález nové kmene *S. avermitilis* zahŕňajúce bunky, ktoré exprimujú mutovanú aveC alelu, alebo jej degenerovaný variant na miesto alebo navyše k divokému typu aveC alely, kde bunky nového kmeňa produkujú avermektíny v narušenom pomere triedy 2:1 v porovnaní s pomerom triedy 2:1 avermektínov produkovaných bunkami rovnakého kmeňa, ktoré

exprimujú len divoký typ aveC alely. V prednostnej forme vynálezu je znížený narušený pomer triedy 2:1 avermektínov produkovaný novými bunkami. Takéto nové kmene sú užitočné na produkciu komerčne žiadúcich avermektínov, ako je napríklad doramektín, vo veľkej mierke. V prednostnejšej forme poskytuje predkladaný vynález nové kmene *S. avermitilis* zahŕňajúce ktorúkoľvek z vyššie uvedených mutácií alebo kombináciu mutácií v aveC alele v nukleotídových pozíciách zodpovedajúcich pozíciám prezentovaných vyššie, alebo ktoré inak kódujú ktorúkoľvek z vyššie uvedených aminokyselinových substitúcií AveC génového produktu. Aj keď takéto mutácie môžu byť prítomné v takých bunkách na extrachromozomálne časti, ako je napríklad plazmid, je preferované, že takéto mutácie sú prítomné v aveC alele lokalizovanej na chromozómu *S. avermitilis*. V prednostnej forme poskytuje predkladaný vynález kmeň *Streptomyces avermitilis* zahŕňajúci bunky mutácií v aveC alele, ktorá kóduje AveC génový produkt majúci substitúciu v jednej alebo viacerých aminokyselinových pozíciách zodpovedajúcich aminokyselinovým rezíduám 38, 48, 55, 89, 99, 111, 136, 138, 139, 154, 179, 228, 230, 238, 266, 275, 289, alebo 298 v sekvencii SEQ ID č. 2, kde bunky produkujú pomer triedy 2:1 avermetínov, ktorý je odlišný od pomeru produkovaného bunkami rovnakého kmeňa *S. avermitilis*, ktorý exprimuje divoký typ aveC alely.

Primárnym cieľom vyhladávacích analýz tu opísaných je identifikovať mutované alely aveC génu, ktorých expresia je v bunkách *S. avermitilis* narušená a konkrétnejšie dochádza na zníženie pomeru triedy 2:1 avermektínov. V prednostnej forme vynálezu je pomer B2:B1 avermektínov produkovaných bunkami nového kmeňa *S. avermitilis*, ktorý je predmetom predkladaného vynálezu, a ktorý exprimuje mutovanú aveC alelu alebo jej degenerovaný variant, a ktorý je predmetom predkladaného

vynálezu, zhruba 1,6:1 alebo menej. V prednostnejšej forme vynálezu je pomer 0,84:1 alebo menej. V prednostnejšej forme vynálezu je pomer 0,80:1 alebo menej. V prednostnejšej forme vynálezu je pomer 0,75:1 alebo menej. V prednostnejšej forme vynálezu je pomer 0,73:1 alebo menej. V prednostnejšej forme vynálezu je pomer 0,68:1 alebo menej. V ešte prednostnejšej forme vynálezu je pomer 0,67:1 alebo menej. V prednostnejšej forme vynálezu je pomer 0,57:1 alebo menej. V ešte prednostnejšej forme vynálezu je pomer 0,53:1 alebo menej. V ešte prednostnejšej forme vynálezu je pomer 0,42:1 alebo menej. V ešte prednostnejšej forme vynálezu je pomer 0,40:1 alebo menej.

V špecifickej forme vynálezu opísanej nižšie produkujú nové bunky, ktoré sú predmetom vynálezu, cyklohexyl B2:cyklohexyl B1 avermektíny v pomere menšom ako 1,6:1. V odlišnej špecifickej forme vynálezu opísanej nižšie produkujú nové bunky, ktoré sú predmetom vynálezu, cyklohexyl B2:cyklohexyl B1 avermektíny v pomere menšom ako 0,94:1. V ďalšej odlišnej špecifickej forme vynálezu opísanej nižšie produkujú nové bunky, ktoré sú predmetom vynálezu, cyklohexyl B2:cyklohexyl B1 avermektíny v pomere menšom ako 0,88:1. V ďalšej odlišnej špecifickej forme vynálezu opísanej nižšie produkujú nové bunky, ktoré sú predmetom vynálezu, cyklohexyl B2:cyklohexyl B1 avermektíny v pomere menšom ako 0,84:1. V ešte ďalšej odlišnej špecifickej forme vynálezu opísanej nižšie produkujú nové bunky, ktoré sú predmetom vynálezu, cyklohexyl B2:cyklohexyl B1 avermektíny v pomere menšom ako 0,75:1. V ešte ďalšej odlišnej špecifickej forme vynálezu opísanej nižšie produkujú nové bunky, ktoré sú predmetom vynálezu, cyklohexyl B2:cyklohexyl B1 avermektíny v pomere menšom ako 0,73:1. V ešte ďalšej odlišnej špecifickej forme vynálezu opísanej nižšie produkujú nové bunky, ktoré sú

predmetom vynálezu, cyklohexyl B2:cyklohexyl B1 avermektíny v pomere menšom ako 0,68:1. V ešte ďalšej odlišnej špecifickej forme vynálezu opísanej nižšie produkujú nové bunky, ktoré sú predmetom vynálezu, cyklohexyl B2:cyklohexyl B1 avermektíny v pomere menšom ako 0,67:1. V ešte ďalšej odlišnej špecifickej forme vynálezu opísanej nižšie produkujú nové bunky, ktoré sú predmetom vynálezu, cyklohexyl B2:cyklohexyl B1 avermektíny v pomere menšom ako 0,57:1. V ešte ďalšej odlišnej špecifickej forme vynálezu opísanej nižšie produkujú nové bunky, ktoré sú predmetom vynálezu, cyklohexyl B2:cyklohexyl B1 avermektíny v pomere menšom ako 0,53:1. V ešte ďalšej odlišnej špecifickej forme vynálezu opísanej nižšie produkujú nové bunky, ktoré sú predmetom vynálezu, cyklohexyl B2:cyklohexyl B1 avermektíny v pomere menšom ako 0,42:1. V ešte ďalšej odlišnej špecifickej forme vynálezu opísanej nižšie produkujú nové bunky, ktoré sú predmetom vynálezu, cyklohexyl B2:cyklohexyl B1 avermektíny v pomere menšom ako 0,40:1.

V ďalšej prednostnej forme poskytuje predkladaný vynález nové kmene *S. avermitilis* zahŕňajúce bunky, ktoré exprimujú mutovanú *aveC* alelu, alebo jej degenerovaný variant, alebo genetický konštrukt obsahujúci *aveC* alelu alebo jej degenerovaný variant na miesto alebo navyše k divokému typu alely, kde bunky nového kmeňa produkujú narušené množstvá avermektínov v porovnaní s bunkami rovnakého kmeňa, ktoré exprimujú len divoký typ *aveC* alely. V prednostnej forme vynálezu produkuje nový kmeň zvýšené množstvá avermektínov. V neobmedzujúcej forme vynálezu zahŕňa genetický konštrukt silný promotor, ako je napríklad silný konštitutívny promotor *ermE* zo *Sacharopolyspora erythraea* v smere hore a v operačnom spojení s *aveC* ORF.

V ďalšej prednostnej forme poskytuje predkladaný vynález nové kmene *S. avermitilis* zahŕňajúce bunky, v ktorých bol *aveC* gén inaktivovaný. Takéto kmene sú užitočné na rozličné spektrum avermektínov, ktoré produkujú v porovnaní s divokým typom kmeňa aj na komplementáciu vyhladávacích analýz, ako je tu opísané, aby sa určilo, či cielená alebo náhodná mutagenézia *aveC* génu ovplyvňuje produkciu avermektínov. V špecifickej forme vynálezu opísanej nižšie boli hostiteľské bunky *S. avermitilis* geneticky upravené, aby obsahovali inaktivovaný *aveC* gén. Napríklad kmeň SE180-11 opísaný v príkladoch nižšie bol generovaný za použitia plazmidu pSE180 nahradzujúceho gén (ATCC 209605) (Obrázok 3), ktorý bol konštruovaný, aby inaktivoval *S. avermitilis* *aveC* gén inzerciou génu *ermE* rezistencie do *aveC* kódujúcej oblasti.

Predkladaný vynález ďalej poskytuje rekombinantne exprimované mutované *S. avermitilis* *AveC* génové produkty kódované ktoroukoľvek z vyššie uvedených polynukleotídových molekúl, ktoré sú predmetom vynálezu a spôsoby ich prípravy.

Predkladaný vynález ďalej poskytuje postup produkcie avermektínov zahŕňajúci kultiváciu buniek kmeňa *S. avermitilis*, a tieto bunky exprimujú mutovanú *aveC* alelu, ktorá kóduje génový produkt, ktorý narušuje pomer triedy 2:1 avermektínov produkovaných bunkami *S. avermitilis* exprimujúcich mutovanú *aveC* alelu v porovnaní s bunkami rovnakého kmeňa, ktoré exprimujú len divoký typ *aveC* alely, v kultivačnom médiu za podmienok, ktoré umožňujú alebo indukujú produkciu avermektínov z týchto buniek. V prednostnej forme vynálezu je znížený pomer triedy 2:1 avermektínov produkovaných v kultúre bunkami exprimujúcimi mutovanú *aveC* alelu. Tento spôsob poskytuje zvýšenú účinnosť v produkcii komerčne cenných avermektínov, ako je napríklad doramektín.

Predkladaný vynález ďalej poskytuje postup produkcie avermektínov zahŕňajúci kultiváciu buniek kmeňa *S. avermitilis*, a tieto bunky expimujú mutovanú *aveC* alelu alebo genetický konštrukt obsahujúci *aveC* alelu, ktorá vedie na produkciu narušeného množstva avermektínov produkovaných bunkami kmeňa *S. avermitilis* exprimujúcich mutovanú *aveC* alelu alebo genetický konštrukt v porovnaní s bunkami rovnakého kmeňa, ktoré neexprimujú mutovanú *aveC* alelu alebo genetický konštrukt, ale miesto toho exprimujú len divoký typ *aveC* alely, v kultivačnom médiu za podmienok, ktoré umožňujú alebo indukujú produkciu avermektínov z týchto buniek, a získanie zmienených avermektínov z kultúry. V prednostnej forme vynálezu je zvýšené množstvo avermektínov produkovaných v kultúre bunkami exprimujúcimi mutovanú *aveC* alelu, degenerovaný variant alebo genetický konštrukt.

Predkladaný vynález ďalej poskytuje nový preparát avermektínov produkovaných kmeňom *S. avermitilis* exprimujúcim mutovanú *aveC* alelu alebo jej degenerovaný variant, ktorá kóduje génový produkt, ktorý znižuje pomer triedy 2:1 avermektínov produkovaných bunkami kmeňa *S. avermitilis* exprimujúcich mutovanú *aveC* alelu alebo jej degenerovaný variant v porovnaní s bunkami rovnakého kmeňa, ktoré miesto toho exprimujú len divoký typ *aveC* alely, kde sú avermektíny v novom preparáte produkované v zníženom pomere triedy 2:1 v porovnaní s pomerom triedy 2:1 avermektínov produkovaných bunkami rovnakého kmeňa *S. avermitilis*, ktoré miesto toho exprimujú len divoký typ *aveC* alely. Nový avermektínový preparát môže byť prítomný, ako je produkovaný vo vyčerpanej fermentačnej kultivačnej tekutine, alebo z nej môže byť stiahnutý. Nový avermektínový preparát môže byť čiastočne alebo významne purifikovaný z kultivačnej tekutiny pomocou

známych biochemických techník purifikácie, ako sú napríklad precipitácie amónium sulfátom, dialýza, frakcionácia podľa veľkosti, ionexová chromatografia, HPLC, atď.

5.4 Použitie avermektínov

Avermektíny sú vysoko aktívne antiparazitárne látky majúce zvláštne využitie ako antihelminťiká, ektoparaziticídy, insekticídy a akaricídy. Avermektínové zlúčeniny produkované podľa spôsobov predkladaného vynálezu sú užitočné pre ktorýkoľvek z týchto účelov. Avermektínové zlúčeniny produkované podľa predkladaného vynálezu sú užitočné napríklad na liečbu rôznych ochorení alebo stavov človeka, zvlášť tých, ktoré sú spôsobené parazitickými infekciami, ako je známe v odbore. Pozri napríklad Ikeda a Omura, 1997, Chem. Rev. 97(7):2591-2609. Konkrétnejšie avermektínové zlúčeniny produkované podľa predkladaného vynálezu sú účinné v liečbe celého radu ochorení alebo stavov spôsobených endoparazitmi, ako sú napríklad parazitické nematódy, ktoré môžu infikovať človeka, domáce zvieratá, prasce, ovce, hydinu, kone alebo dobytok.

Špecifickejšie avermektínové zlúčeniny produkované podľa predkladaného vynálezu sú účinné nematódom, ktoré infikujú človeka, rovnako tak ako nematódy, ktoré infikujú rôzne druhy živočíchov. Také nematódy zahŕňajú gastrointestinálne parazity, ako sú napríklad Ancylostoma, Necator, Ascaris, Strongyloides, Trichinella, Trichuris, Enterobius, Dirofilaria a parazity, ktoré sa nachádzajú v krvi iných tkanív a orgánov, ako sú napríklad filariálne červíky a črevné formy Strongyloides a Trichinella.

Avermektínové zlúčeniny produkované podľa predkladaného vynálezu sú tiež účinné v liečbe ektoparazitických infekcií zahŕňajúcich napríklad infestáciu sŕpcov a vtákov artropodmi, spôsobených kliešťami, roztočmi, všami, blchami, mäsiarkami, bodavým hmyzom alebo migrujúcimi larvami dvojkrídlového hmyzu, ktoré môžu napadnúť medzi inými dobytok a kone.

Avermektínové zlúčeniny produkované podľa predkladaného vynálezu sú tiež užitočné ako insekticídy proti domácim škodcom, ako sú napríklad medzi inými švábi, mole, kobercové chrobáky a domáce muchy, rovnako tak ako hmyz napadajúci uskladnené zrno a poľnohospodárske rastliny, a tieto škodci zahŕňajú medzi inými roztoče, mšice, húsenice a hmyz z rodu Ortoptera, ako sú napríklad kobylky.

Zvieratá, ktoré môžu byť liečené avermektínovými zlúčeninami produkovanými podľa vynálezu, zahŕňajú ovce, dobytok, jelene, kozy, prasce, vtáky vrátane hydiny a psi a mačky.

Avermektínová zlúčenina produkovaná podľa predkladaného vynálezu je podávaná v preparáte vhodnom na špecifické zamýšľané použitie, konkrétny druh hostiteľského zvierata, ktoré má byť liečené a parazitov alebo hmyzu, ktorý je infekčným agens. Na použitie ako parazitocídum môže byť avermektínová zlúčenina produkovaná podľa predkladaného vynálezu podávaná vo forme kapsle, bolu, tablety alebo tekutého lieku, alebo môže byť alternatívne podaná ako forma polievacia, injekčná alebo ako implantát. Takéto formy sú pripravené konvenčným spôsobom v zhode so štandardnou veterinárnou praxou. Kapsle, bolusy alebo tablety môžu byť teda pripravené zmiešaním aktívnej zložky s vhodnou presne rozdelenou riediacou látkou alebo s nosičom, ďalej obsahujúcim

dezintegračnú látku a/alebo väzbovú látku, ako sú napríklad škrob, laktóza, mastenec, magnézium stearát, atď. Namáčacie preparáty môžu byť pripravené disperziou aktívnej zložky vo vodnom roztoku spolu s napríklad dispergujúcou alebo zvlhčujúcou látkou. Injekčné preparáty môžu byť pripravené vo forme sterilného roztoku, ktorý môže obsahovať ďalšie substancie, ako sú napríklad dostatočné soli a/alebo glukóza, aby mohol byť pripravený roztok izotonický s krvou.

Takéto preparáty sa líšia váhou aktívnej zlúčeniny v závislosti na pacientovi, druhu hostiteľského zvieraťa, ktoré má byť liečené, závažnosti a typu infekcie a telesnej váhy hostiteľa. Všeobecne je na perorálne podanie dostatočná dávka aktívnej zlúčeniny od zhruba 0,001 do 10 mg na kg telesnej váhy pacienta alebo zvieraťa podanej ako jedna dávka alebo rozdelené počas od 1 do 5 dní. Môžu ale nastať prípady, kde je indikované vyššie alebo nižšie dávkovacie rozmedzie, ako je určené napríklad lekárom alebo veterinárom podľa klinických príznakov.

Ako alternatíva môže byť avermektínová zlúčenina produkovaná podľa predkladaného vynálezu podaná v kombinácii s krmivom pre zvieratá a na tento účel môže byť pripravené koncentrované krmivové aditívum alebo premix na zmiešanie s normálnym krmivom pre zvieratá.

Na použitie ako insekticídum a na liečbu poľnohospodárskych škodcov môže byť avermektínová zlúčenina produkovaná podľa predkladaného vynálezu podaná ako sprej, prášok, emulzia a podobne v zhode so štandardnou poľnohospodárskou praxou.

Príklady uskutočnenia vynálezu

6. Fermentácia *Streptomyces avermitilis* a analýza B2:B1 avermektínov

Kmene bez aktivity dehydrogenázy vetvených 2-oxo kyselín aj 5-O-metyltransfreázy neprodukujú žiadne avermektíny, pokiaľ fermentačné médium nie je suplementované mastnými kyselinami. Tento príklad demonštruje, že pre také mutanty môže byť získané široké spektrum pomerov B2:B1 avermektínov, keď je fermentácia zahájená v prítomnosti rôznych mastných kyselín.

6.1 Materiál a metodika

Bunky *Streptomyces avermitilis* ATCC 53692 boli skladované pri teplote -70°C ako plný bujón pripravený v očkovacím médiu zloženom zo: škrobu (Nadex, Laing National) - 20g; Pharmamedia (Trader's Protein, Memphis, TN) - 15 g; Ardamín pH (Yeast Products Inc.) - 5 g; uhličitanu vápenatého - 1 g. Finálny objem bol upravený na 1 liter tečúcou vodou, pH bolo upravené na 7,2 a médium bolo autoklávané pri teplote 121°C počas 25 minút.

Na inokuláciu nádoby obsahujúcej rovnaké médium boli použité dva ml rozmrazenej suspenzie vyššie uvedeného preparátu. Po 48 hodinách inkubácie pri teplote 28°C na rotačnej trepačke pri rýchlosti 180 rpm, boli použité 2 ml bujónu na inokuláciu nádoby obsahujúcej 50 ml produkčného média obsahujúceho: škrob - 80 g; uhličitan vápenatý - 7 g; Pharmamedia - 5 g; hydrogen fosfát draselný - 1g; síran horečnatý - 1 g; kyselina glutamová - 0,6 g; heptahydrát síranu železnatého - 0,01 g; síran zinočnatý - 0,001 g; síran manganatý - 0,001 g. Finálny objem bol upravený do 1 litra

tečúcou vodou, pH bolo upravené na 7,2 a médium bolo autoklávované pri teplote 121 °C počas 25 minút.

Rozličné substráty karboxylovej kyseliny (pozri Tabuľka 1) boli rozpustené v metanole a pridané do fermentačného bujónu 24 hodín po inokulácii za vzniku finálnej koncentrácie 0,2 g/liter. Fermentačný bujón bol inkubovaný 14 dní pri teplote 28 °C, potom bol bujón zcentrifúgovaný (2500 rpm, počas 2 minút) a supernatant bol odstránený. Mycéliová peleta bola extrahovaná acetónom (15 ml), potom dichlórmetanom (30 ml) a organická fáza bola separovaná, sfiltrovaná a potom odparená do sucha. Rezíduum bolo extrahované do metanolu (1 ml) a analyzované pomocou HPLC pomocou kvapalinového chromatografu Hewlett-Packard 1090A vybavenom skenovacím diode-array detektorom pri 240 nm. Bola použitá kolóna Beckman Ultrasphere C-18, 5 µm, 4,6 mm x 25 cm, teplota kolóny bola udržiavaná na 40 °C. Na kolónu bolo injikovaných 25 µl vyššie uvedeného metanolickeho roztoku. Elúcia bola uskutočnená lineárnym gradientom metanol-voda z pomeru 80:20 do 95:5 počas 40 minút pri prietoku 0,85 ml/minútu. Na kalibráciu odpovede detektora boli použité dve štandardné koncentrácie cyklohexylu B1 a bola meraná plocha pod krivkami B2 a B1 avermektínov.

6.2 Výsedky

HPLC retenčné časy pozorované pre B2 a B1 avermektíny a pomery 2:1 sú uvedené v tabuľke 1

Tabuľka 1

Substrát	HPLC retenčný čas (min)		Pomer
	B2	B1	B2:B1
4-Tetrahydropyran karboxylová kyselina	8,1	14,5	0,25
Kyselina izomaslová	10,8	18,9	0,5
Kyselina 3-furoová	7,6	14,6	0,62

Kyselina S-(+)-2-metylmaslová	12,8	21,6	1,0
Kyselina cyklohexankarboxylová	16,9	26,0	1,6
Kyselina 3-tiofénkarboxylová	8,8	16,0	1,8
Kyselina cyklopentankarboxylová	14,2	23,0	2,0
Kyselina 3-trifluórometylmaslová	10,9	18,8	3,9
Kyselina 2-metylpentanoová	14,5	24,9	4,2
Kyselina cykloheptankarboxylová	18,6	29,0	15,0

Dáta prezentované v tabuľke 1 demonštrujú extrémne široké rozmedzie pomerov B2:B1 avermektínových produktov, čo ukazuje na významný rozdiel vo výsledkoch dehydratačnej konverzie triedy 2 zlúčenín na triedu 1 zlúčenín, v závislosti na charaktere bočného reťazca mastnej kyseliny dodávanej ako iniciačná zlúčenina. To ukazuje, že zmeny v pomeroch B2:B1, ktoré sú výsledkom alterácií AveC proteínu, môžu byť špecifické konkrétnym substrátom. Následné vyhľadávanie mutantov vykazujúcich zmeny v pomere B2:B1 získané s konkrétnym substrátom musia byť uskutočňované v prítomnosti tohto substrátu. Následné príklady opísané nižšie používajú kyselinu cyklohexankarboxylovú ako substrát na vyhľadávanie mutantov. Tento substrát je ale používaný len ako príklad potenciálu a nie je zamýšľaný ako obmedzujúci použiteľnosť predkladaného vynálezu.

7. Izolácia aveC génu

Tento príklad opisuje izoláciu a charakterizáciu oblasti chromozómu *Streptomyces avermitilis*, ktorý kóduje AveC génový produkt. Ako je demonštrované nižšie, bol aveC gén identifikovaný ako schopný modifikovať pomer produkovaných cyklohexyl B2 avermektínov na cyklohexyl B1 avermektíny (B2:B1).

7.1. Materiál a metodika

7.1.1. Rast *Streptomyces* na izoláciu DNA

Na rast *Streptomyces* bola použitá nasledujúca metóda. Jednotlivé kolónie *S. avermitilis* ATCC 31272 (izolát jednotlivej kolónie č. 2) boli izolované na polovičnej pôde YPD-6 obsahujúcej: Difco kvasničný extrakt - 5 g; Difco Bacto-pepton - 5 g; dextróza - 2,5 g; MOPS - 5 g; Difco Bacto agar - 5 g. Finálny objem bol upravený na 1 liter pomocou dH₂O, pH bolo upravené na 7,0 a médium bolo autoklávané pri teplote 121 °C počas 25 minút.

Mycélia vykultivované na vyššie uvedenom médiu boli použité na inokuláciu 10 ml TSB média (Difco Tryptic Soy Broth - 30 g, v 1 litri dH₂O, autoklávané pri teplote 121 °C počas 25 minút) v skúmavke s rozmermi 25 x 150 mm, ktorá bola trepaná (300 rpm) pri teplote 28 °C počas 48-72 hodín.

7.1.2. Chromozomálna DNA izolácia zo *Streptomyces*

Alikvóty (0,25 ml alebo 0,5 ml) mycélia vykultivovaného, ako bolo opísané vyššie, boli umiestnené v 1,5 ml mikrocentrifugačných skúmavkách a bunky boli zakoncentrované centrifugáciou pri 12 000 g počas 60 sekúnd. Supernatant bol odstránený a bunky boli resuspendované v 0,25 ml TSE pufru (20 ml 1,5 M sacharózy, 2,5 ml 1M Tris-HCl, pH 8,0, 2,5 ml 1M EDTA, pH 8,0 a 75 ml dH₂O) obsahujúcim 2 mg/ml lysozymu. Vzorky boli inkubované pri teplote 37 °C počas 20 minút pri trepaní, vložené do automatizovaného zariadenia na izoláciu nukleových kyselín AutoGen 540™ (Integrated Separation systems, Natick, MA) a genomická DNA bola izolovaná za

použitia Cycle 159 (software zariadenie) podľa inštrukcií výrobcu.

Alternatívne bolo 5 ml mycélia umiestnených do skúmavky s rozmermi 17 x 100 mm, bunky boli zakoncentrované centrifugáciou pri 3000 rpm počas 5 minút a supernatant bol odstránený. Bunky boli resuspendované v 1 ml TSE pufri, zakoncentrované centrifugáciou pri 3000 rpm počas 5 minút a supernatant bol odstránený. Bunky boli resuspendované v 1 ml TSE pufri obsahujúcom 2 mg/ml lysozymu a inkubované pri teplote 37 °C pri trepaní počas 30-60 minút. Po inkubácii sa pridalo 0,5 ml 10% dodecyl sulfátu sodného (SDS) a bunky boli inkubované pri teplote 37 °C až do dokončenia lýzy. Lyzát bol inkubovaný pri teplote 65 °C počas 10 minút, ochladený na teplotu miestnosti, rozdelený do dvoch ependorfiek a extrahovaný 1x 0,5 ml fenol/chlóroformom (50% fenol napred ekvilibrovaný 0,5 M Trisom, pH 8,0; 50% chlóroform). Vodná fáza bola odstránená a extrahovaná 2 až 5 x zmesou chlóroform:izoamylalkohol (24:1). DNA bola precipitovaná pridaním 1/10 objemu 3M octanu sodného, pH 4,8, inkubáciou zmesi na ľade 10 minút, centrifugáciou zmesi pri 15000 rpm pri teplote 5 °C počas 10 minút, a vybraním supernatantu do čistej skúmavky, do ktorej bol pridaný 1 objem izopropanolu. Supernatant plus zmes izopropanolu bola potom inkubovaná na ľade počas 20 minút pri 5 °C, supernatant bol odstránený a DNA peleta bola premytá 1x 70% etanolom. Po vysušení pelety bola DNA resuspendovaná v TE pufri (10 mM Tris, 1 mM EDTA, pH 8,0).

7.1.3. Izolácia plazmidovej DNA zo *Streptomyces*

Alikvóta (1,0 ml) mycélia bola umiestnená do 1,5 ml mikrocentrifugačných skúmaviek a bunky boli zakoncentrované centrifugáciou pri 12000 g počas 60 sekúnd. Supernatant bol

odstránený, bunky boli resuspendované v 1,0 ml 10,3% sacharóze a zakoncentrované centrifugáciou pri 12000 g počas 60 sekúnd a supernatant bol odstránený. Bunky boli potom resuspendované v 0,25 ml TSE pufru obsahujúcej 2 mg/ml lysozymu a inkubovanej pri teplote 37 °C počas 20 minút pri trepaní a nanesené do automatizovaného zariadenia na izoláciu nukleových kyselín AutoGen 540™. Plazmidová DNA bola izolovaná za použitia softwaru Cycle 106 podľa inštrukcií výrobcu.

Alternatívne bolo 1,5 ml mycélia umiestnené do 1,5 ml mikrocentrifugačných skúmaviek a bunky boli zakoncentrované centrifugáciou pri 12000 g počas 60 sekúnd. Supernatant bol odstránený, bunky boli resuspendované v 1,0 ml 10,3% sacharózy a zakoncentrované centrifugáciou pri 12000 g počas 60 sekúnd a supernatant bol odstránený. Bunky boli resuspendované v 0,5 ml TSE pufru obsahujúcej 2 mg/ml lysozymu a inkubovanej pri teplote 37 °C počas 15-30 minút. Po inkubácii sa pridalo 0,25 ml alkalického SS (0,3 N NaOH, 2% SDS) a bunky boli inkubované pri teplote 55 °C počas 15-30 minút, až bol roztok čistý. Do roztoku DNA bol pridaný octan sodný (0,1 ml, 3M, pH 4,8) a roztok bol potom inkubovaný na ľade počas 10 minút. Vzorky DNA boli centrifugované pri 14000 rpm počas 10 minút pri teplote 5 °C. Supernatant bol vybraný do čistej skúmavky a pridalo sa 0,2 ml zmesi fenol:chlóroform (50% fenol:50% chlóroform) a zmes bola jemne premiešavaná. Roztok DNA bol centrifugovaný pri 14000 rpm počas 10 minút pri teplote 5 °C a vrchná vrstva bola vybraná do čistej ependorfky. Bol pridaný izopropanol (0,75 ml) a roztok bol jemne premiešavaný a potom inkubovaný pri teplote miestnosti počas 20 minút. Roztok DNA bol centrifugovaný pri 14000 rpm počas 15 minút pri teplote 5 °C, supernatant bol odstránený a DNA peleta bola premytá 70% etanolom, vysušená a resuspendovaná v TE pufri.

7.1.4. Izolácia plazmidovej DNA z *E. coli*

Jediná transformovaná kolónia *E. coli* bola inokulovaná do 5 ml Luria-Bertani (LB) média (Bacto-Trypton - 10 g, Bacto-kvasničný extrakt - 5 g a NaCl - 10 g v 1 litri dH₂O, pH 7,0, autoklávané pri 121 °C počas 25 minút a suplementované 100 µg/ml ampicilínu). Kultúra bola inkubovaná cez noc a 1 ml alikvóty boli umiestnené do 1,5 ml mikrocentrifugačnej skúmavky. Vzorky kultúry boli nanesené na automatizované zariadenie na izoláciu nukleových kyselín AutoGen 540™ a plazmidová DNA bola izolovaná za použitia softwaru Cycle 106 podľa inštrukcií výrobcu.

7.1.5. Príprava a transformácia protoplastov *S. avermitilis*

Jednotlivé kolónie *S. avermitilis* boli izolované na 1/2 média YPD-6. Mycélie boli použité na inokuláciu 10 ml média TSB v skúmavke s rozmermi 25 mm x 150 mm, ktoré bolo potom inkubované pri trepaní (300 rpm) pri teplote 28 °C počas 48 hodín. Jeden ml mycélia bol použitý na inokuláciu 50 ml YEME média. YEME médium obsahuje na jeden liter: Difco kvasničný extrakt - 3 g; Difco Bacto-pepton - 5 g; Difco Mat Extract - 3 g; sacharóza - 300 g. Po autoklávaní pri teplote 121 °C počas 25 minút boli pridané nasledujúce substancie: 2,5 M MgCl₂ · 6 H₂O (separátne autoklávané pri teplote 11 °C počas 25 minút) - 2 ml; a glycín (20%) (sterilizácia filtrom) - 25 ml.

Mycélie boli kultivované pri teplote 30 °C počas 48-62 hodín a zbierané centrifugáciou v 50 ml centrifugačnej skúmavke (Falcon) pri 3000 rpm počas 20 minút. Supernatant bol odstránený a mycélie boli resuspendované v P pufri, ktorý obsahuje: sacharózu - 205 g; K₂SO₄ - 0,25 g; MgCl₂ · 6 H₂O -

2,02 g; H₂O - 600 ml; K₂PO₄ (0,55) - 10 ml; roztok stopových prvkov* - 20 ml; CaCl₂ . 2H₂O (3,68%) - 100 ml; a MES pufo (1,0 M, pH 6,5 - 10 ml. (* Roztok stopových prvkov obsahuje na jeden liter: ZnCl₂ - 40 mg; FeCl₃ . 6H₂O - 200 mg; CuCl₂ . 2H₂O - 10 mg; MnCl₂ . 4H₂O - 10 mg; Na₂B₄O₇ . 10H₂O - 10 mg; (NH₄)₆ Mo₇O₂₄ . 4H₂O - 10 mg). pH bolo upravené na 6,5, finálny objem bol upravený na 1 liter a médium bolo horúce sfiltrované cez 0,45 mikrónový filter.

Mycélie boli speletované pri 3000 rpm počas 20 minút, supernatant bol odstránený a mycélie boli resuspendované v 20 ml P pufru obsahujúcom 2 mg/ml lysozymu. Mycélie boli inkubované pri teplote 35 °C počas 16 minút pri trepaní a kontrolované mikroskopicky, aby sa určil rozsah tvorby protoplastov. Keď bola tvorba protoplastov dokončená, boli protoplasty centrifugované pri 8000 rpm počas 10 minút. Supernatant bol odstránený a protoplasty boli resuspendované v 10 ml P pufru. Protoplasty boli centrifugované pri 8000 rpm počas 10 minút, supernatant bol odstránený, protoplasty boli resuspendované v 2 ml P pufru a približne 1×10^9 protoplastov bolo distribuovaných do 2,0 ml kryogénnych vialiek (Nalgene).

Vialka obsahujúca 1×10^9 protoplastov bola centrifugovaná pri 8000 rpm počas 10 minút, supernatant bol odstránený a protoplasty boli resuspendované v 0,1 ml P pufru. Do protoplastov boli pridané 2 až 5 µg transformujúcej sa DNA okamžite nasledovanej pridaním 0,5 ml pracovného T pufru. Základ T pufru obsahoval: PEG-1000 (Sigma)-25 g; sacharózu-2,5 g; H₂O-83 ml. pH bolo upravené na 8,8 pomocou 1N NaOH (sterilizácia filtráciou) a základ T pufru bol sterilizovaný filtráciou a uskladnený pri 4 °C. Pracovný T pufo pripravený rovnaký deň, keď bol pripravený, sa skladal zo základu T pufru-8,3 ml; K₂PO₄ (4 mM)-1,0 ml; CaCl₂.2H₂O (5M)-0,2 ml; a TS

(1M, pH 8) - 0,5 ml. Každá zložka pracovného T pufru bola individuálne sterilizovaná filtráciou.

Počas 20 sekúnd pridávania T pufru do protoplastov bol tiež pridany 1,0 ml P pufru a protoplasty boli centrifugované pri 8000 rpm počas 10 minút. Supernatant bol odstránený a protoplasty boli resuspendované v 0,1 ml P pufru. Protoplasty boli potom umiestnené do RM14 média, ktoré obsahuje: sacharózu-205 g; K_2SO_4 -0,25 g; $MgCl_2 \cdot 6H_2O$ -10,12 g; glukóza 10 g; Difco Casamino kyseliny-0,1 g; Difco kvasničný extrakt-5 g; Difco Oatmeal Agar-3g; Difco Bacto Agar-22 g; dH_2O -800 ml. Roztok bol zautoklávovaný pri teplote 121 °C počas 25 minút. Po autoklávovaní boli pridané sterilné zásobné roztoky: K_2PO_4 (0,5%)-10 ml; $CaCl_2 \cdot 2 H_2O$ (5 M); L-prolin (20%)-15 ml; MES pufor (1,0 M, pH 6,5)-10 ml; roztok stopových prvkov (rovnaký ako je uvedené vyššie)-2 ml; cykloheximidový zásobný roztok (25 mg/ml-40 ml; a 1 N NaOH-2 ml. Dvadsať päť ml média RM14 bolo alikvótne nanesených na doštičku a doštičky boli vysušané 24 hodín pred použitím.

Protoplasty boli inkubované v 95% vlhkosti pri teplote 30 °C počas 20-24 hodín. Na výber transformantov rezistentných na tiostreptón bol rovnomerne rozptýlený 1 ml prekryvného pufru obsahujúceho 125 µg tiostreptónu na 1 ml na regeneračné desičky RM14. Prekryvný pufor obsahoval na 100 ml: sacharózu-10,3 g; roztok stopových prvkov (rovnaký ako je uvedené vyššie)-0,2 ml; a MES (1M, pH 6,5)-1 ml. Protoplasty boli inkubované v 95% vlhkosti pri teplote 30 °C počas 7-14 dní do tej doby, ako sa stali kolónie rezistentné na tiostreptón (Tio^r) viditeľné.

7.1.6. Transformácia protoplastov *Streptomyces lividans*

V niektorých prípadoch bola použitá na transformácia *S. lividans* TK64 (poskytnutá John Innes Institute, Norwich, Spojené kráľovstvo). Spôsoby a zloženie na rast, tvorbu protoplastov a transformáciu *S. lividans* sú opísané v publikácii Hopwood et al., 1985, Genetic Manipulation of *Streptomyces*, A Laboratory Manual, John Innes Foundation, Spojené kráľovstvo, a uskutočnené podľa postupov tu opísaných. Plazmidová DNA bola izolovaná zo *S. lividans*, ako je opísané v Časti 7.1.3. vyššie.

7.1.7. Fermentačná analýza kmeňov *S. avermitilis*

Mycélia *S. avermitilis* kultivovaná na 1/2 YPD-6 počas 4-7 dní bola inokulovaná 1x6 palcových skúmaviek obsahujúcich 8 ml preformovaného média a dve 5 mm sklenené guľičky. Preformované médium obsahovalo: rozpustný škrob (buď málo povarený škrob alebo tiež KOSO, Japan Corn Starch Co., Nagoya) - 20 g/l; Pharmamedia-15 g/l; Ardamín pH-5 g/l (Champlain Ind. Clifton, NJ); CaCO_3 -2 g/l; 2xbcfa ("bcfa" znamená masťné kyseliny s vetveným reťazcom) obsahujúci finálnu koncentráciu v médiu 50 ppm 2-(+/-)-metylmaslovej kyseliny, 60 ppm izomaslovej kyseliny a 20 ppm kyseliny izovalerovej. pH bolo upravené na 7,2 a médium bolo zautoklávované pri teplote 121 °C počas 25 minút.

Skúmavka bola pretrepaná v uhlí 17° pri 215 rpm pri teplote 29 °C počas 3 dní. Na inokuláciu 300 ml Erlenmeyerovej nádoby obsahujúcej 25 ml produkčného média obsahujúceho: škrob (buď málo povarený škrob alebo tiež KOSO) - 160 g/l; Nutrisoy (Archer daniels Midland, Decatur, IL) - 10 g/l; Ardamín pH-10 g/l; K_2HPO_4 -2 g/l; $\text{MgSO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ -2 g/l; $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ -0,02 g/l; MnCl_2 -

0,002 g/l; $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ - 0,002 g/l; CaCO_3 - 14 g/l; 2x bcf a (ako vyššie); a cyklohexan karboxylovú kyselinu (CHC) vytvorenú ako 20% roztok pri pH 7,0) - 800 ppm bola použitá 2 ml alikvóta inokulačnej kultúry. pH bolo upravené na 6,9 a médium bolo zautoklávované pri teplote 121 °C počas 25 minút.

Po inokulácii bola nádoba inkubovaná pri teplote 29 °C počas 12 dní s pretrepaním pri 200 rpm. Po inkubácii boli 2 ml vzorky odobrané z nádoby, nariadené 8 ml metanolu, zmiešané a zmes bola centrifugovaná pri 1250 g počas 10 minút, aby došlo na peletizáciu zvyškov. Supernatant bol potom analyzovaný pomocou HPLC za použitia kolóny Beckman Ultrasphere ODS (25 cm x 4,6 mm vnútorný priemer) s prietokom 0,75 ml/min a s detekciou pomocou absorbančie pri 240 nm. Mobilná fáza bola 86/8,9/5,1 metanol/voda/acetonitril.

7.1.8. Izolácia génov *S. avermitilis*

Kozmidová knižnica *S. avermitilis* (ATCC 31272, SC-2) chromozomálnej DNA bola pripravená a hybridizovaná s ketosyntázovou próbou pripravenou z fragmentu génu pre polyketíd syntázu (PKS) zo *Saccharopolyspora erythraea*. Detailný opis prípravy kozmidových knižníc sa môže nájsť v publikácii Sambrook et al., 1989, vyššie. Detailný opis prípravy chromozomálnych DNA knižníc *Streptomyces* je uvedený v publikácii Hopwood et al., 1985, vyššie. Kozmidové klony obsahujúce ketosyntázu hybridizujúce oblasti boli identifikované hybridizáciou s 2,7 kB Nde/Eco47III fragmentom z pEX26 (láskavo poskytnutým dr. P. Leadlay, Cambridge, Spojené kráľovstvo). Približne 5 ng pEX26 bolo natrávených pomocou NdeI a Eco47III. Reakčná zmes bola nanosená na 0,8% agarózový gél SeaPlaque GTG (FMC BioProducts, Rockland, ME). Po elektroforéze bol vyrezaný z gélu 2,7 kB NdeI/Eco47III

fragment a DNA sa získala z gélu za použitia GELase™ od Epicentre Technologies za použitia Fst Protocol. 2,7 kB NdeI/Eco47III fragment bol označený [α -³²]dCTP (deoxycytidín 5'-trifosfát, tetra (trietylamónium) sol', [α -³²P]-) (NEN-Dupont, Boston, MA) za použitia systému BRL Nick Translation Systém (BRL Life Technologies, Inc., Gaithersburg, MD), podľa inštrukcií dodávateľa. Typická reakcia bola uskutočnená v objeme 0,05 ml. Po pridaní 5 μ l zastavovacieho pufru bola označená DNA oddelená od neinkorporovaných nukleotídov za použitia G-25 Sephadex Quick Spin™ kolónií (Boehringer Mannheim) podľa inštrukcií dodávateľa.

Približne 1800 kozmidových klonov sa prehliadalo hybridizáciou kolónií. Desať klonov bolo identifikovaných ako silno hybridizujúcich s Sacc. erythraea KS próbou. Kolónie E. coli obsahujúce kozmidovú DNA boli kultivované v LB tekutom médiu a kozmidová DNA bola izolovaná z každej kultúry v automatizovanom zariadení na izoláciu nukleových kyselín AutoGen 540™ za použitia programu Cycle 3 (software zariadenie) podľa inštrukcií výrobcu. Mapovanie restriktívnej endonukleázou a analýzy Southern blot odhalili, že päť z klonov obsahovalo prekrývajúce sa chromozomálne oblasti. Genomická BamHI restriktívna mapa S. avermitilis piatich kozmidov (to je pSE65, pSE 66, pSE67, pSE68, pSE69) bola skonštruovaná analýzou prekrývajúcich sa kozmidov a hybridizáciou (Obrázok 4).

7.1.9. Identifikácia DNA, ktorá moduluje pomery Avermektínov B2:B1 a identifikácia aveC ORF

Na testovanie subklonovaných fragmentov odvodených od pSE66 kozmidového klonu boli použité pre AveC mutanty

nasledujúce metódy na zistenie schopnosti modulácie pomerov avermektínov B2:B1. PSE66 (5 µg) bol natrávený pomocou SacI a BamHI. Reakčná zmes bola nanosená na 0,8% agarózový gél SeaPlaque GTG (FMC BioProducts, Rockland, ME), po elektroforéze bol vyrezaný z gélu 2,9 kB SacI/BamHI fragment a DNA sa získala z gélu za použitia GELase™ (Epicentre Technologies) za použitia Fast Protocol. Približne 5 µg transportného vektoru pWHM3 (Vara et al., 1989, J Bacteriol 171:5872-5881) sa natrávalo pomocou SacI a BamHI. Okolo 0,5 µg 2,9 Kb inzertu a 0,5 µg natráveného pWHM3 bolo spolu zmiešané a inkubované cez noc s 1 jednotkou ligázy (New England Biolabs, Inc, Beverly, MA) pri teplote 15 °C v celkovom objeme 20 µl podľa inštrukcií dodávateľa. Po inkubácii bolo 5 µl ligačnej zmesi inkubovaných pri teplote 70 °C počas 10 minút, zmes bola ochladená na teplotu miestnosti a použila sa na transformáciu kompetentných E. coli DH5α buniek (BRL) podľa inštrukcií dodávateľa. Plazmidová DNA bola izolovaná z ampicilín rezistentných transformantov a prítomnosť 2,9 kB Sac/BamHI inzertu bola potvrdená restričnou analýzou. Plazmid bol označený ako pSE119.

Protoplasty kmene *S. avermitilis* 1100-SC38 (kmeň od spoločnosti Pfizer) boli pripravené a transformované pomocou pSE119, ako je opísané v časti 7.1.5 vyššie. Kmeň 1100-SC38 je mutant, ktorý produkuje významne viacej cyklohexyl-B2 formy avermektínu v porovnaní s cyklohexyl-B1 formou avermektínu, keď je suplementovaný cyklohexan karboxylovou kyselinou (B2:B1 je zhruba 30:1). PSE119 použitý na transformáciu protoplastov *S. avermitilis* bol izolovaný buď z kmeňa *E. coli* GM2163 (získaný od dr. BJ Bachmanna, správca, *E. coli* Genetic Stock Center, Yale University), kmeňa *E. coli* DM1 (BRL), alebo z kmeňa *S. lividans* TK64. Tiostreptón rezistentné transformanty

kmeňa 1100-SC38 boli izolované a analyzované HPLC analýzou fermentačných produktov. Transformanty kmeňa *S. avermitilis* 1100-SC38 obsahujúce pSE119 viedli na narušený pomer cyklohexyl-B2:cyklohexyl-B1 avermektínov, ktorý bol zhruba 3,7:1 (Tabuľka 2).

Po zistení, že pSE119 je schopný modulovať pomery B2:B1 avermektínov pre AveC mutanty bola sekvenovaná inzerovaná DNA. Približne 10 µg pSE119 bolo izolovaných pomocou izolačného kitu na plazmidovú DNA (Qiagen, Valencia, CA) podľa inštrukcií výrobcu, a sekvenované za použitia automatizovaného sekvenačného zariadenia ABI 373A Automated DNA Sequencer (Perkin Elmer, Foster City, CA). Sekvenačné údaje boli zoradené a editované za použitia programov Genetic Computer Group (GCG, Madison, WI). DNA sekvencia a aveC ORF sú prezentované na Obrázku 1 (SEQ ID č.1).

Nový plazmid, označený ako pSE118, bol skonštruovaný nasledujúcim spôsobom. Približne 5 µg pSE66 sa natrávilo pomocou SphI a BamHI. Reakčná zmes bola nanosená na 0,8% agarózový gél SeaPlaque GTG (FMC BioProducts), po elektroforéze sa vyrezal z gélu 2,8 kB SphI/BamHI fragment a DNA sa získala z gélu za použitia GELase™ (Epicentre Technologies) za použitia Fast Protocol. Približne 5 µg transportného vektoru pWHM3 sa natrávilo pomocou SphI a BamHI. Okolo 0,5 µg 2,8 Kb inzertu a 0,5 µg natráveného pWHM3 bolo spolu zmiešané a inkubované cez noc s 1 jednotkou ligázy (New England Biolabs) pri teplote 15 °C v celkovom objeme 20 µl podľa inštrukcií dodávateľa. Po inkubácii bolo 5 µl ligačnej zmesi inkubovaných pri teplote 70 °C počas 10 minút, zmes bola ochladená na teplotu miestnosti a použitá na transformáciu kompetentných *E. coli* DH5α buniek (BRL) podľa inštrukcií

dodávateľa. Plazmidová DNA bola izolovaná z ampicilín rezistentných transformantov a prítomnosť 2,8 kB Sph/BamHI inzertu bola potvrdená restričnou analýzou. Plazmid bol označený ako pSE118. Inzerované DNA v pSE118 a pSE119 sa prekrývali približne 838 nukleotídmi (Obrázok 4).

Protoplasty kmeňa *S. avermitilis* 1100-SC38 boli transformované pomocou pSE118, ako je uvedené vyššie. Tiostreptón rezistentné transformanty kmeňa 1100-SC38 boli izolované a analyzované HPLC analýzou fermentačných produktov. Transformanty kmeňa *S. avermitilis* 1100-SC38 obsahujúce pSE118 viedli na narušenie pomerov cyklohexyl-B2:cyklohexyl-B1 avermektínov v porovnaní s kmeňom 1100-SC38 (Tabuľka 2).

7.1.10. PCR amplifikácia aveC génu z chromozomálnej DNA *S. avermitilis*

Zhruba 1,2 Kb fragment obsahujúci aveC ORF bol izolovaný z chromozomálnej DNA pomocou PCR amplifikácie za použitia primérov označených na základe aveC nukleotídovej sekvencie získanej vyššie. PCR priméry boli dodané spoločnosťou Genosys Biotechnologies Inc. (Texas). Pravostranný primér bol: 5'-TCACGAAACCGGACACAC-3' (SEQ ID č:6) a ľavostranný primér bol: 5'-CATGATCGCTGAACCGAG-3' (SEQ ID č:7). PCR reakcia bola uskutočnená polymerázou Deep Vent™ (New England Biolabs) v pufri poskytnutom výrobcom a v prítomnosti 300 uM dNTP, 10% glycerolu, 200 pmol každého priméru, 0,1 µg templátu a 2,5 jednotiek enzýmu vo finálnom objeme 100 µl za použitia termocykléru Perkin-Elmer Cetus. Termálny profil prvého cyklu bol 95 °C počas 5 minút (denaturačný krok), 60°C počas 2 minút (chladiaci krok) a 72 °C počas 2 minút (rozširovací krok). Následných 24 cyklov malo rovnaký termálny profil s výnimkou

toho, že denaturačný krok bol skrátený na 45 sekúnd a chladiaci krok bol skrátený na 1 minútu.

PCR produkt bol podrobený elektroforéze na 1% agarózovom géli a bol detekovaný jeden DNA pásik s veľkosťou 1,2 Kb. Táto DNA bola purifikovaná z gélu a ligovaná s 25 ng linearizovaného, hrubého pCR-Blunt vektoru (Invitrogén) v 1:10 molárnym vektor/inzert pomeru podľa inštrukcií výrobcu. Ligačná zmes bola použitá na transformáciu One Shot™ Competent E. coli buniek (Invitrogén) podľa inštrukcií výrobcu. Plazmidová DNA bola izolovaná z ampicilín rezistentných transformantov a prítomnosť inzertu s veľkosťou zhruba 1,2 Kb bola potvrdená restričnou analýzou. Plazmid bol označený ako pSE179.

DNA inzertu z pSE179 bola izolovaná natrávením pomocou BamHI/XbaI, separovaná elektroforézou, purifikovaná z gélu a ligovaná s transportným vektorom pWHM3, ktorý bol natrávený pomocou BamHI/XbaI v celkovej koncentrácii DNA 1 µg v 1:5 molárnym vektor/inzert pomeru. Ligačná zmes bola použitá na transformáciu kompetentných E. coli DH5α buniek (BRL) podľa inštrukcií dodávateľa. Plazmidová DNA bola izolovaná z ampicilín rezistentných transformantov a prítomnosť zhruba 1,2 kB inzertu bola potvrdená restričnou analýzou. Plazmid, ktorý bol označený ako pSE186 (Obrázok 2, ATCC 209604), bol transformovaný do E. coli DM1 a plazmidová DNA bola izolovaná z ampicilín rezistentných transformantov.

7.2. Výsledky

2,9 Kb SacI/BamHI z pSE119 bol identifikovaný tak, že po transformácii do kmeňa S. avermitilis 1100-SC38 významne narušil pomer B2:B1 avermektínovej produkcie. Kmeň S.

avermitilis 1100-SC38 má normálny pomer B2:B1 zhruba 30:1, ale keď je transformovaný vektorom obsahujúcim 2,9 Kb SacI/BamHI fragment, pomer B2:B1 avermektínov sa znížil na zhruba 3,7:1. Postfermentačná analýza kultúr transformantov potvrdila prítomnosť transformujúcej DNA.

2,9 Kb pSE119 fragment bol sekvenovaný a bol identifikovaný zhruba 0,9 Kb ORF (Obrázok 1) SEQ ID č:1), ktorý zahŕňa Pst/SphI fragment, ktorý bol predtým inaktivovaný, aby produkoval len B2 produkty (Ikeda et al., 1995, vyššie). Porovnanie tohto ORF, alebo jeho zodpovedajúceho odvodeného polypeptídu proti známym knižniciam (GénomBL, SWIS-PROT) nepreukázal silnú homológiu so známou DNA alebo proteínovou sekvenciou.

Tabuľka 2 uvádza fermentačnú analýzu kmeňa *S. avermitilis* 1100-SC38 transformovanej rôznymi plazmidmi.

Tabuľka 2

Kmeň <i>S. avermitilis</i> transformujúci plazmid	Počet testovaných transformantov	Priemerný pomer B2:B1
1100-SC38 (žiadny)	9	30,66
1100-SC38 (pWHM3)	21	31,3
1100-SC38 (pSE119)	12	3,7
1100-SC38 (pSE119)	12	30,4
1100-SC38 (pSE185)	14	27,9

8. Príklad: Konštrukcia mutantov AveC *S. avermitilis*

Tento príklad opisuje konštrukciu niekoľkých rôznych mutantov AveC *S. avermitilis* za použitia preparátov a metód tu opísaných. Všeobecný opis techník na zavedenie mutácií do génu

Streptomyces je opísaný Kieserom a Hopwoodom, 1991, Meth Enzym 204:430-458. Detailnejší opis je poskytnutý Anzaïom et al 1988, J Antibiot XLI(2):226-233 a Stutzman-Engwallom et al., 1992, J. Bacteriol. 174(1):144-154. Tieto referencie sú týmto začlenené v celom svojom rozsahu.

8.1 Inaktivácia génu *aveC* *S. avermitilis*

AveC mutanty obsahujúce inaktivované *aveC* gény boli skonštruované za použitia niekoľkých metód, ako je detailne uvedené nižšie.

V prvej metóde bol 640 bp *Sph*/*Pst*I fragment z *aveC* génu v pSE119 (plazmid opísaný v časti 7.1.9 vyššie) nahradený génom *ermE* (na rezistenciu na erytromycín) zo *Sacc. Erythraea*. Gén *ermE* bol izolovaný z pIJ4026 (poskytnutý ústavom John Innes Institute, Norwich, Spojené kráľovstvo, pozri tiež Bibb et al., 1985, Gene 41:357-368) natrávením restričným enzýmom pomocou *Bg*/II a *Eco*RI s následnou elektroforézou a potom bol z gélu purifikovaný. Tento zhruba 1,7 Kb fragment bol ligovaný do pGEM72f (Promega), ktorý bol natrávený pomocou *Bam*HI a *Eco*RI a ligačná zmes bola transformovaná do kompetentných *E. coli* DH5 α buniek podľa inštrukcií výrobcu. Plazmidová DNA bola izolovaná z ampicilín rezistentných transformantov a prítomnosť zhruba 1,7 Kb inzertu bola potvrdená restričnou analýzou. Plazmid bol označený ako pSE27.

PSE118 (opísaný v časti 7.1.9. vyššie) bol natrávený pomocou *Sph*I a *Bam*HI, natrávený produkt bol podrobený elektroforéze a zhruba 2,8 Kb *Sph*I/*Bam*HI inzert bol purifikovaný z gélu. PSE119 bol natrávený pomocou *Pst*I a *Eco*RI, natrávený produkt bol podrobený elektroforéze a zhruba 1,5 Kb *Pst*I/*Eco*RI inzert bol purifikovaný z gélu. Transportný

vektor pWHM3 bol natrávený pomocou BamHI a EcoRI. PSE27 bol natrávený pomocou PstI a SphI, natrávený produkt bol podrobený elektroforéze a zhruba 1,7 Kb PstI/SphI inzert bol purifikovaný z gélu. Všetky štyri fragmenty (to je zhruba 2,8 Kb, zhruba 1,5 Kb, zhruba 7,2 Kb, zhruba 1,7 Kb) boli spolu ligované v štvorcestnej ligácii. Ligačná zmes bola transformovaná do kompetentných E.coli DH5α buniek podľa inštrukcií výrobcu. Plazmidová DNA bola izolovaná z ampicilín rezistentných transformantov a prítomnosť správneho inzertu bola potvrdená restričnou analýzou. Plazmid bol označený ako pSE180 (Obrázok 3; ATCC 209605).

PSE180 bol transformovaný do S. lividans TK64 a transformované kolónie boli identifikované pomocou rezistencie na tiostrepton a erytromycín. PSE180 bol izolovaný zo S. lividans a použitý na transformáciu protoplastov S. avermitilis. Boli identifikované štyri transformanty rezistentné na tiostrepton a protoplasty boli pripravené a umiestnené za neselektívnych podmienok do RM14 média. Po regenerácii protoplastov boli jednotlivé kolónie prehliadané na prítomnosť rezistencie na erytromycín a neprítomnosť rezistencie na tiostrepton, čo ukazuje na chromozomálnu integráciu inaktivovaného aveC génu a stratu voľného replikónu. Jeden Erm^r Tio^s transformant bol identifikovaný a označený ako kmeň SE180-11, natrávený restričnými enzýmami BamHI, HindIII, PstI, alebo SphI, podrobený elektroforéze na 0,8% agarózovom géli, prenesený na nylónové membrány a hybridizovaný s ermE próbou. Tieto analýzy preukázali, že chromozomálna integrácia génu ermE rezistencie a konkomitantná delécia 640 bp PstI/SphI fragmentu sa vyskytla v dôsledku dvojitého crossoveru. HPLC analýza fermentačných produktov

kmeňa SE180-11 preukázala, že normálne avermektíny už neboli produkované (Obrázok 5A).

V druhej metóde inaktivácie *aveC* génu bol 1,7 Kb *erm* gén odstránený z chromozómu kmeňa *S. avermitilis* SE180-11 zanechávajúc 640 bp *Pst*I/*Sph*I deléciu v *aveC* géne. Plazmid na náhradu génu bol skonštruovaný nasledujúcim spôsobom: pSE180 bol čiastočne natrávený pomocou *Xba*I a zhruba 11,4 Kb fragment bol purifikovaný z gélu. Pásik s veľkosťou zhruba 11,4 Kb je bez 1,7 Kb génu pre *ermE* rezistenciu. DNA bola potom ligovaná a transformovaná do *E. coli* DH5 α buniek. Plazmidová DNA bola izolovaná z ampicilín rezistentných transformantov a prítomnosť správneho inzertu bola potvrdená restriktčnou analýzou. Plazmid, ktorý bol označený ako pSE184, bol transformovaný do *E. coli* DM1 a plazmidová DNA bola izolovaná z ampicilín rezistentných transformantov. Tento plazmid bol použitý na transformáciu protoplastov kmeňa *S. avermitilis* SE180-11. Protoplasty boli pripravené z transformantov kmeňa SE180-11 rezistentných na tistreptón a boli umiestnené ako jednotlivé kolónie do RM14. Po zregenerovaní protoplastov boli jednotlivé kolónie prehliadané na neprítomnosť rezistencie na erytromycín aj tlostreptón, čo ukazuje na chromozomálnu integráciu inaktivovaného *aveC* génu a stratu voľného replikónu obsahujúceho *ermE* gén. Jeden *Erm*^s *Tio*^s transformant bol identifikovaný a označený ako SE184-1-13. Fermentačná analýza SE184-1-13 preukázala, že normálne avermektíny už neboli produkované, a že SE184-1-13 mal rovnaký fermentačný profil ako SE180-11.

V treťom spôsobe inaktivácie *aveC* génu bol do chromozomálneho *aveC* génu začlenený posun rámca pridaním dvoch báz G po C v nt pozícii 471 za použitia PCR, čím došlo na

vytvorenie miesta BspE1. Prítomnosť vytvoreného miesta BspE1 bola užitočná na detekciu náhrady génu. PCR produkty boli navrhnuté tak, aby došlo na začlenenie frameshift mutácie do aveC génu a tieto priméry boli dodané spoločnosťou Genosys Biotechnologies, Inc. Pravostranný primér mal sekvenciu: 5'-GGTTCGGATGCCGTTCTCG-3' (SEQ ID č:8) a ľavostranný primér mal sekvenciu: 5'-AACTCCGGTCGACTCCCCCTTC-3 (SEQ ID č:9). Podmienky PCR boli rovnaké, ako je opísané v časti 7.1.10. vyššie. 666 bp PCR produkt bol natrávený pomocou SphI za vzniku dvoch fragmentov s veľkosťou 278 bp a 388. Fragment s veľkosťou 388 bp bol purifikovaný z gélu.

Plazmid na náhradu génu bol skonštruovaný nasledujúcim spôsobom: transportný vektor pWHM3 bol natrávený pomocou EcoRI a BamHI. pSE119 bol natrávený pomocou BamHI a SphI, natrávená zmes bola podrobená elektroforéze a zhruba 840 bp fragment bol purifikovaný z gélu. PSE119 bol natrávený pomocou EcoRI a XmnI, natrávená zmes bola podrobená elektroforéze a fragment s veľkosťou zhruba 1,7 Kb bol purifikovaný z gélu. Všetky štyri fragmenty (to je zhruba 7,2 Kb, zhruba 840 bp, zhruba 1,7 Kb a zhruba 388 bp) boli spolu ligované v štvorcestnej ligácii. Ligačná zmes bola transformovaná do kompetentných E.coli DH5 α buniek. Plazmidová DNA bola izolovaná z ampicilín rezistentných transformantov a prítomnosť správneho inzertu bola potvrdená restriktčnou analýzou a DNA analýzou. Plazmid, ktorý bol označený ako pSE185, bol transmorfovaný do E. coli DM1 a plazmidová DNA bola izolovaná z ampicilín rezistentných transformantov. Tento plazmid bol použitý na transformáciu protoplastov kmeňa S. avermitilis 1100-S38. Tiostreptón rezistentné transformanty kmeňa 1100-SC38 boli izolované a analyzované HPLC analýzou fermentačných produktov. PSE185

nenarušoval významne pomery B2:B1 avermektínov po transformácii do kmeňa *S. avermitilis* 1100-SC38 (Tabuľka 2).

PSE185 bol použitý na transformáciu protoplastov *S. avermitilis* na tvorbu frameshift mutácie v chromozomálnom *aveC* génu. Protoplasty boli pripravené z tiostreptón rezistentných transformantov a umiestnené ako jednotlivé kolónie do RM14. Po regenerácii protoplastov boli jednotlivé protoplasty prehliadané na rezistenciu na tiostreptón. Z tiostreptón senzitívnych kolónií bola izolovaná chromozomálna DNA, ktorá bola prehliadaná pomocou PCR na frameshift mutácie integrované do chromozómu. PCR priméry boli navrhnuté na základe *aveC* nukleotídovej sekvencie a boli dodané spoločnosťou Genosys Biotechnologies, Inc. (Texas). Pravostranný primér mal sekvenciu: 5'-GCAAGGATACGGGGACTAC-3' (SEQ ID č:10) a ľavostranný primér mal sekvenciu: 5'-GAACCGACCGCCTGATAC-3' (SEQ ID č:11). Podmienky PCR boli rovnaké, ako je opísané v časti 7.1.10. vyššie. Získaný PCR produkt mal 543 bp, po natrávení pomocou Bsp boli pozorované tri fragmenty s veľkosťou 368 bp, 96 bp a 79 bp, čo ukazuje na chromozomálnu integráciu inaktivovaného *aveC* génu a stratu voľného replikónu.

Fermentačná analýza mutantov *S. avermitilis* obsahujúcich frameshift mutáciu v *aveC* géne preukázala, že normálne avermektíny už neboli produkované, a že tieto mutanty mali rovnaký fermentačný HPLC profil ako kmene SE180-11 a SE184-1-13. Jeden Tio⁸ transformant bol identifikovaný a označený ako kmeň SE185-5a.

Navyše došlo na tvorbu mutácie v *aveC* géne, ktorá mení nt pozíciu 520 z G na A, ktorá vedie na zmenu kodónu kódujúceho tryptofan (W) v pozícii 116 za terminačný kodón. Kmeň *S.*

avermertilis s touto mutáciou neprodukoval normálne avermektíny a mal rovnaký fermentačný profil ako kmene SE180-11, SE184-1-13 a SE185-5a.

Navyše došlo na tvorbu mutácií v aveC géne, ktoré menia: (i) nt pozíciu 970 z G na A, čo mení amínokyselinu v pozícii 266 z glycínu (G) na aspartát (D), a (ii) nt pozíciu 996 z T na C, čo mení amínokyselinu v pozícii 275 z tyrosínu (Y) na histidín (H). Kmeň S. avermitilis s týmito mutáciami (G256D/Y275H) neprodukoval normálne avermektíny a mal rovnaký fermentačný profil ako kmene SE180-11, SE184-1-13 a SE185-5a.

Mutované kmene S. avermitilis SE180-11, SE184-1-13, SE185-5a a ďalšie tu poskytnuté s inaktiváciou aveC, poskytujú vyhľadávací nástroj na posúdenie dopadu iných mutácií aveC génu. PSE186, ktorý obsahuje divokú kópiu aveC génu, bol transformovaný do E. coli DM1 a plazmidová DNA bola izolovaná z ampicilín rezistentných transformantov. Táto pSE186 DNA bola použitá na transformáciu protoplastov kmeňa S. avermitilis SE180-11. Tiostreptón rezistentné transformanty kmeňa SE180-11 boli izolované a bola určená prítomnosť rezistencie na erytromycín, a Tio^r Erm^r transformanty boli analyzované HPLC analýzou fermentačných produktov. Prítomnosť funkčného aveC génu *in trans* bola schopná reštaurovať normálnu produkciu avermektínov v kmeni SE180-11 (Obrázok 5B).

8.2. Analýza mutácií v aveC géne, ktoré narušujú pomery tried B2:B1

Ako je opísané vyššie, bol kmeň S. avermitilis SE180-11 obsahujúci neaktívny aveC gén komplementovaný transformáciou s plazmidom obsahujúcim funkčný aveC gén (pSE186). Kmeň SE180-11

bol tiež využitý ako hostiteľský kmeň na charakterizáciu ďalších mutácií aveC génu, ako je opísané nižšie.

Chromozomálna DNA bola izolovaná z kmeňa 1100-SC38 a použitá ako templát na PCR amplifikáciu aveC génu. ORF s veľkosťou 1,2 Kb bol izolovaný PCR ampifikáciou za použitia primérov navrhnutých na základe aveC nukleotídovej sekvencie. Pravostranný primér mal sekvenciu SEQ ID č:6 a ľavostranný primér mal sekvenciu SEQ ID č:7 (pozri Časť 7.1.10 vyššie). Podmienky PCR a subklonovania boli rovnaké, ako je opísané v časti 7.1.10. Analýza DNA sekvencie ORF s veľkosťou 1,2 Kb preukázala mutáciu v aveC géne, ktorá mení nt pozíciu 337 z C na T, čo mení amínokyselinu v pozícii 55 zo serínu (S) na fenylalanín (F). AveC gén obsahujúci mutáciu S55F bol subklonovaný do pWHM3 za vzniku plazmidu, ktorý bol označený ako pSE187, a ktorý bol použitý na transformáciu protoplastov kmeňa *S. avermitilis* SE180-11. TioStreptón rezistentné transformanty kmeňa SE180-11 boli izolované, bola určená prítomnosť rezistencie na erytromycín a Tio^r Erm^r transformanty boli analyzované HPLC analýzou fermentačných produktov. Prítomnosť aveC génu kódujúceho zámenu v amínokyselinovom rezíduu 55 (S55F) bola schopná reštaurovať pre kmeň SE180-11 normálnu produkciu avermektínov (Obr. 5C); ale cyklohexyl B2: cyklohexyl B1 pomer bol zhruba 26:1 v porovnaní s kmeňom SE180-11 transformovaným pomocou pSE186, ktorý mal pomer B2:B1 zhruba 1,6:1 (Tabuľka 3), čo ukazuje, že jediná mutácia (S55F) moduluje množstvo produkovaného cyklohexyl-B2 k cyklohexyl-B1.

Ďalšia mutácia v aveC géne bola identifikovaná, že mení nt pozíciu 862 z G na A, čo vedie na zámenu amínokyseliny v pozícii 230 z glycínu (G) na aspartát (D). Kmeň *S. avermitilis*

majúci túto mutáciu (G230D) produkuje avermektíny v pomere B2:B1 zhruba 30:1.

8.3. Mutácie, ktoré redukujú B2:B1 pomer

Niektoré mutácie boli konštruované, že znižujú množstvo cyklohexyl-B1 nasledujúcim spôsobom.

Mutácia v *aveC* géne bola identifikovaná, že mení nt pozíciu 588 z G na A, čo vedie na zmenu aminokyseliny v pozícii 139 z alanínu (A) na treonín (T). *aveC* gén obsahujúci A139T mutáciu bol subklonovaný do pWHM3 za vzniku plazmidu, ktorý bol označený pSE188, a ktorý bol použitý na transformáciu protoplastov kmeňa *S. avermitilis* SE180-11. Tiosreptón rezistentné transformanty kmeňa SE180-11 boli izolované, bola určená prítomnosť rezistencie na erytromycín a Tio^r Erm^r transformanty boli analyzované HPLC analýzou fermentačných produktov. Prítomnosť mutovaného *aveC* génu kódujúceho zmenu v aminokyselinovom rezíduu 139 (A139T) bola schopná reštaurovať pre kmeň SE180-11 normálnu produkciu avermektínov (Obr. 5D); ale B2:B1 pomer bol zhruba 0,94:1, čo ukazuje, že táto mutácia znižuje množstvo produkovaného cyklohexyl-B2 k cyklohexyl-B1. Tento výsledok bol neočakávaný, pretože publikované výsledky, rovnako tak ako výsledky mutácií opísaných vyššie, len demonštrovali buď inaktiváciu *aveC* génu alebo zvýšenú produkciu B2 formy avermektínov vo vzťahu k B1 forme (Tabuľka 3).

Pretože A139T mutácia narušila pomer B2:B1 v prospešnejšom B1 smere, bola skonštruovaná mutácia, ktorá kodovala treonín miesto serínu v aminokyselinovej pozícii 138. PSE186 bol teda natrávený pomocou EcoRI a klonovaný do pGEM3Zf (Promega), ktorý bol natrávený pomocou EcoRI. Plazmid, ktorý

bol označený ako pSE186a, bol natrávený pomocou ApaI a KpnI, DNA fragmenty boli separované na agarózovom géli a dva fragmenty s veľkosťou zhruba 3,8 Kb a 0,4 Kb boli purifikované z gélu. DNA inzert s veľkosťou zhruba 1,2 Kb z pSE186 bol použitý ako PCR templát na založenie zámeny jedinej bázy v nt pozícii 585. Boli navrhnuté PCR priméry na založenie mutácie v nt pozícii 585, ktoré boli dodané spoločnosťou Genosys Biotechnologies, Inc. (Texas). Pravostranný primér mal sekvenciu: 5'-GGGGGCGGGCCCGGGTGC GGAGGCGGAAATGCCCCTGGCGACG-3' (SEQ ID č:12); a ľavostranný primér mal sekvenciu: 5'-GGAACCGACCGCCGCTGATACA-3' (SEQ ID č:13). PCR reakcia bola uskutočnená za použitia genomického PCR kitu Advantage GC (Clontech Laboratories, Palo Alto, CA) v pufri poskytnutom výrobcom, v prítomnosti 200 μ M dNTP, 200 pmol každého priméru, 50 ng templátovej DNA, 1,0 M GC-Melt a 1 jednotky KlenTaq Polymerase mix vo finálnom objeme 50 μ l. Termálny profil prvého cyklu bol 94 °C počas 1 minúty, nasledovaný 25 cyklami pri teplote 94 °C počas 30 sekúnd a 68 °C počas 2 minút, a 1 cyklom pri teplote 68 °C počas 3 minút. PCR produkt s veľkosťou 295 bp bol natrávený pomocou ApaI a KpnI, aby došlo na uvoľnenie 254 bp fragmentu, ktorý bol podrobený elektroforéze a purifikovaný z gélu. Všetky 3 fragmenty (zhruba 3,8 Kb, 0,4 Kb a 254 bp) boli spolu ligované v trojcestnej ligácii. Ligačná zmes bola transformovaná do kompetentných E.coli DH5 α buniek. Plazmidová DNA bola izolovaná z ampicilín rezistentných transformantov a prítomnosť správneho inzertu bola potvrdená restriktčnou analýzou. Plazmid bol označený ako pSE198.

PSE198 bol natrávený pomocou EcoRI, klonovaný do pWHM3, ktorý bol natrávený pomocou EcoRI a transformovaný do E.coli DH5 α buniek. Plazmidová DNA bola izolovaná z ampicilín

rezistentných transformantov a prítomnosť správneho inzertu bola potvrdená restriktčnou analýzou a analýzou sekvencie DNA. Plazmidová DNA bola transformovaná do *E.coli* DM1, plazmidová DNA bola izolovaná z ampicilín rezistentných transformantov a prítomnosť správneho inzertu bola potvrdená restriktčnou analýzou. Plazmid, ktorý bol označený ako pSE190, bol použitý na transformáciu protoplastov kmeňa *S. avermitilis* SE180-11. Tiostreptón rezistentné transformanty kmeňa SE180-11 boli izolované, bola určená prítomnosť rezistencie na erytromycín a Tio^r Erm^r transformanty boli analyzované HPLC analýzou fermentačných produktov. Prítomnosť mutovaného *aveC* génu kódujúceho zámenu v amínokyselinovom rezíduu 138 (S138T) bola schopná reštaurovať pre kmeň SE180-11 normálnu produkciu avermektínov; ale B2:B1 pomer bol zhruba 0,88:1, čo ukazuje, že táto mutácia znižuje množstvo produkovaného cyklohexyl-B2 k cyklohexyl-B1 (Tabuľka 3). Tento pomer B2:B1 je dokonca nižší ako pomer 0,94:1 pozorovaný u mutácie A139T produkovanej transformáciou kmeňa SE180-11 pomocou pSE188, ako je opísané vyššie.

Ďalšia mutácia bola skonštruovaná za účelom začlenenia treonínu do amínokyselinových pozícií 138 aj 139. DNA inzert s veľkosťou zhruba 1,2 Kb z pSE186 bol použitý ako PCR templát. Boli navrhnuté PCR priméry na založenie mutácií v nt pozíciách 585 a 588, ktoré boli dodané spoločnosťou Genosys Biotechnologies, Inc. (Texas). Pravostranný primér mal sekvenciu: 5'-GGGGGCGGGCCCGGGTGCGGAGGCGGAAATGCCGCTGGCGACGACC-3' (SEQ ID č:14); a ľavostranný primér mal sekvenciu: 5'-GGAACATCACGGCATTACACC-3' (SEQ ID č:15). PCR reakcia bola uskutočnená za použitia podmienok opísaných vyššie v tejto časti. PCR produkt s veľkosťou 449 bp bol natrávený pomocou *ApaI* a *KpnI*, aby došlo na uvoľnenie 254 bp fragmentu, ktorý bol podrobený elektroforéze a purifikovaný z gélu. PSE186a bol

natrávený pomocou ApaI a KpnI, DNA fragmenty boli separované na agarózovom geli a dva fragmenty s veľkosťou zhruba 3,8 Kb a 0,4 Kb boli purifikované z gélu. Všetky 3 fragmenty (zhruba 3,8 Kb, 0,4 Kb a 254 bp) boli spolu ligované v trojcestnej ligácii. Ligačná zmes bola transformovaná do kompetentných E.coli DH5α buniek. Plazmidová DNA bola izolovaná z ampicilín rezistentných transformantov a prítomnosť správneho inzertu bola potvrdená restričnou analýzou. Plazmid bol označený ako pSE230.

PSE230 bol natrávený pomocou EcoRI, naklonovaný do pWHM3, ktorý bol natrávený pomocou EcoRI a transformovaný do E.coli DH5α buniek. Plazmidová DNA bola izolovaná z ampicilín rezistentných transformantov a prítomnosť správneho inzertu bola potvrdená restričnou analýzou a analýzou sekvencie DNA. Plazmidová DNA bola transformovaná do E.coli DM1, plazmidová DNA bola izolovaná z ampicilín rezistentných transformantov a prítomnosť správneho inzertu bola potvrdená restričnou analýzou. Plazmid, ktorý bol označený ako pSE231, bol použitý na transformáciu protoplastov kmeňa *S. avermitilis* SE180-11. Tiostreptón rezistentné transformanty kmeňa SE180-11 boli izolované, bola určená prítomnosť rezistencie na erytromycín a Tio^r Erm^r transformanty boli analyzované HPLC analýzou fermentačných produktov. Prítomnosť mutovaného *aveC* génu kódujúceho S138T/A139T bola schopná reštaurovať pre kmeň SE180-11 normálnu produkciu avermektínov; ale B2:B1 pomer bol zhruba 0,84:1, čo ukazuje, že táto mutácia ďalej znižuje množstvo produkovaného cyklohexyl-B2 k cyklohexyl-B1 (Tabuľka 3) v porovnaní so znížením dosiahnutým transformáciou kmeňa SE180-11 pomocou pSE188 alebo pSE199, ako je opísané vyššie.

Ďalšia mutácia bola skonštruovaná za účelom ďalšieho zníženia množstva produkovaného cyklohexyl B2 k cyklohexyl B1. Pretože S138T/A139T mutácia narušila pomer B2:B1 v prospešnejšom B1 smere, bola skonštruovaná mutácia za účelom začlenenia treonínu v amínokyselinovej pozícii 138 a fenylalanínu v amínokyselinovej pozícii 139. DNA inzert s veľkosťou zhruba 1,2 Kb z pSE186 bol použitý ako PCR templát. Boli navrhnuté PCR priméry na založenie mutácie v nt pozícii 585 (zámena T za A), 588 (zámena G za T) a 589 (zámena C za T), ktoré boli dodané spoločnosťou Genosys Biotechnologies, Inc. (Texas). Pravostranný primér mal sekvenciu: 5'-GGGGGCGGGCCCCGGGTGCGGAGGCGGAAATGCCGCTGGCGACGTTC-3' (SEQ ID č:25); a ľavostranný primér mal sekvenciu: 5'-GGAACATCACGGCATTACACC-3' (SEQ ID č:15). PCR reakcia bola uskutočnená za použitia genomického PCR kitu Advatnage GC (Clonetech Laboratoties, Palo Alto, CA) v pufri poskytnutom výrobcom, v prítomnosti 200 µM dNTP, 200 pmol každého priméru, 50 ng templátovej DNA, 1,0 M GC-Melt a 1 jednotky Tth DNA Polymerase vo finálnom objeme 50 µl. Termálny profil prvého cyklu bol 94 °C počas 1 minúty, nasledovaný 25 cyklami pri teplote 94 °C počas 30 sekúnd a 68 °C počas 2 minút, a 1 cyklom pri teplote 68 °C počas 3 minút. PCR produkt s veľkosťou 449 bp bol natrávený pomocou ApaI a KpnI, aby došlo na uvoľnenie 254 bp fragmentu, ktorý bol podrobený elektroforéze a purifikovaný z gélu. Všetky 3 fragmenty (zhruba 3,8 Kb, 0,4 Kb a 254 bp) boli spolu ligované v trojcestnej ligácii. Ligačná zmes bola transformovaná do kompetentných E.coli DH5α buniek. Plazmidová DNA bola izolovaná z ampicilín rezistentných transformantov a prítomnosť správneho inzertu bola potvrdená restriktčnou analýzou. Plazmid bol označený ako pSE238.

PSE238 bol natrávený pomocou EcoRI, naklonovaný do pWHM3, ktorý bol natrávený pomocou EcoRI a transformovaný do E.coli DH5 α buniek. Plazmidová DNA bola izolovaná z ampicilín rezistentných transformantov a prítomnosť správneho inzertu bola potvrdená restričnou analýzou a analýzou sekvencie DNA. Plazmidová DNA bola transformovaná do E.coli DM1, plazmidová DNA bola izolovaná z ampicilín rezistentných transformantov a prítomnosť správneho inzertu bola potvrdená restričnou analýzou. Plazmid, ktorý bol označený ako pSE239, bol použitý na transformáciu protoplastov kmeňa *S. avermitilis* SE180-11. Tio^r Erm^r transformanty kmeňa SE180-11 boli izolované, bola určená prítomnosť rezistencie na erytromycín a Tio^r Erm^r transformanty boli analyzované HPLC analýzou fermentačných produktov. Prítomnosť dvojito mutovaného aveC génu kódujúceho S138T/A139F bola schopná reštaurovať pre kmeň SE180-11 normálnu produkciu avermektínov; ale B2:B1 pomer bol zhruba 0,75:1, čo ukazuje, že táto mutácia ďalej znižuje množstvo produkovaného cyklohexyl-B2 k cyklohexyl-B1 (Tabuľka 3) v porovnaní so znížením dosiahnutým transformáciou kmeňa SE180-11 pomocou pSE188, pSE199, alebo pSE231, ako je opísané vyššie.

Tabuľka 3

Kmeň <i>S. avermitilis</i> (transformujúci plazmid)	n testovaných transformantov	Relatívny c B2	Relatívny c B1	Priemerný pomer B2:B1
SE180-11 (žiadny)	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

Ďalšie mutácie boli skonštruované za účelom ďalšieho zníženia množstva produkovaného cyklohexyl B2 k cyklohexyl B1 za použitia techniky DNA presúvania, ako je opísané v publikácii Stemmer, 1994, Nature 370:389-391; a Stemmer, 1994, Proc Natl Acad Sci USA 91:10747-10751, a ďalej v patentoch United States Patents 5605793, 5811238, 5830721 a 5837458.

DNA presúvacie plazmidy obsahujúce mutované aveC gény boli transformované do kompetentných dam dcm E.coli buniek. Plazmidová DNA bola izolovaná z ampicilín rezistentných transformantov a použitá na transformáciu protoplastov kmeňa SE180-11. Tiostreptón rezistentné transformanty kmeňa SE180-11 boli izolované a analyzované na produkciu avermektínov s pomerom cyklohexyl-B2: cyklohexyl-B1 1:1 alebo menej. Bola určená DNA sekvencia plazmidovej DNA z SE180-11 transformantov produkujúcich avermektíny s pomerom B2:B1 1:1 alebo menej.

Bolo identifikovaných osem transformantov produkujúcich znížené množstvá cyklohexyl-B2 k cyklohexyl-B1. Najnižší pomer B2:B1 dosiahnutý medzi týmito transformantami bol 04:1 (Tabuľka 4). Plazmidová DNA bola izolovaná z každého z ôsmich transformantov a bola určená DNA sekvencia za účelom identifikácie mutácií v aveC géne. Mutácie sú nasledujúce.

PSE290 obsahuje 4 nukleotídové mutácie v nt pozícii 317 z T na A, v nt pozícii 353 z C na A, v nt pozícii 438 z G na A a v nt pozícii 1155 z T na A. Nukleotídová zámena v nt pozícii 317 vedie na zmenu amínokyseliny v pozícii 48 z D na E a nukleotídová zámena v nt pozícii 438 vedie na zmenu amínokyseliny v pozícii 89 z A na T. Pomer B2:B1 produkovaný bunkami nesúcimi tento plazmid bol 0,42:1 (Tabuľka 4).

PSE291 obsahuje 4 nukleotídové mutácie v nt pozícii 272 z G na A, v nt pozícii 585 z T na A, v nt pozícii 588 z G na A a v nt pozícii 708 z G na A. Nukleotídová zámena v nt pozícii 585 vedie na zámenu amínokyseliny v pozícii 138 z S na T, nukleotídová zámena v nt pozícii 588 vedie na zámenu amínokyseliny v pozícii 139 z A na T a nukleotídová zámena v nt pozícii 708 vedie na zámenu amínokyseliny v pozícii 179 z G na S. Pomer B2:B1 produkovaný bunkami nesúcimi tento plazmid bol 0,57:1 (Tabuľka 4).

PSE292 obsahuje rovnaké 4 nukleotídové mutácie ako pSE290. Pomer B2:B1 produkovaný bunkami nesúcimi tento plazmid bol 0,40:1 (Tabuľka 4).

PSE293 obsahuje 6 nukleotídových mutácií v nt pozícii 24 z A na G, v nt pozícii 286 z A na C, v nt pozícii 497 z T na C, v nt pozícii 554 z C na T, v nt pozícii 580 z T na C a v nt pozícii 886 z A na T. Nukleotídová zámena v nt pozícii 286 vedie na zámenu amínokyseliny v pozícii 38 z Q na P, nukleotídová zámena v nt pozícii 580 vedie na zámenu amínokyseliny v pozícii 136 z L na P a nukleotídová zámena v nt pozícii 886 vedie na zámenu amínokyseliny v pozícii 238 z E na G. Pomer B2:B1 produkovaný bunkami nesúcimi tento plazmid bol 0,68:1 (Tabuľka 4).

PSE294 obsahuje 6 nukleotídových mutácií v nt pozícii 469 z T na C, v nt pozícii 585 z T na A, v nt pozícii 588 z G na A, v nt pozícii 708 z G na A, v nt pozícii 833 z C na T a v nt pozícii 1184 z G na A. Navyše sú nukleotídy v pozíciách 173, 174 a 175 deletované. Nukleotídová zámena v nt pozícii 469 vedie na zámenu amínokyseliny v pozícii 99 z F na S, nukleotídová zámena v nt pozícii 585 vedie na zámenu amínokyseliny v pozícii 138 z S na T, nukleotídová zámena v nt

pozícii 588 vedie na zámenu amínokyseliny v pozícii 139 z A na T a nukleotídová záměna v nt pozícii 708 vedie na záměnu amínokyseliny v pozícii 179 z G na S. Pomer B2:B1 produkovaný bunkami nesúcimi tento plazmid bol 0,53:1 (Tabuľka 4).

PSE295 obsahuje 2 nukleotídové mutácie v nt pozícii 588 z G na A a v nt pozícii 856 z T na C. Nukleotídová záměna v nt pozícii 588 vedie na záměnu amínokyseliny v pozícii 139 z A na T a nukleotídová záměna v nt pozícii 856 vedie na záměnu amínokyseliny v pozícii 228 z M na T. Pomer B2:B1 produkovaný bunkami nesúcimi tento plazmid bol 0,80:1 (Tabuľka 4).

PSE296 obsahuje 5 nukleotídových mutácií v nt pozícii 155 z T na C, v nt pozícii 505 z G na T, v nt pozícii 1039 z C na T, v nt pozícii 1202 z C na T a v nt pozícii 1210 z T na C. Nukleotídová záměna v nt pozícii 505 vedie na záměnu amínokyseliny v pozícii 111 z G na V a nukleotídová záměna v nt pozícii 1039 vedie na záměnu amínokyseliny v pozícii 289 z P na L. Pomer B2:B1 produkovaný bunkami nesúcimi tento plazmid bol 0,73:1 (Tabuľka 4).

PSE297 obsahuje 4 nukleotídové mutácie v nt pozícii 377 z G na T, v nt pozícii 588 z G na A, v nt pozícii 633 z A na G, v nt pozícii 1067 z A na T. Nukleotídová záměna v nt pozícii 588 vedie na záměnu amínokyseliny v pozícii 139 z A na T, nukleotídová záměna v nt pozícii 633 vedie na záměnu amínokyseliny v pozícii 154 z K na E, nukleotídová záměna v nt pozícii 1067 vedie na záměnu amínokyseliny v pozícii 298 z Q na H. Pomer B2:B1 produkovaný bunkami nesúcimi tento plazmid bol 0,67:1 (Tabuľka 4).

Tabuľka 4

Kmeň <i>S. avermitilis</i> (transformujúci plazmid)	n testovaných transformantov	Relatívny c B2	Relatívny c B1	Priemerný pomer B2:B1
SE180-11 (žiadny)	4	0	0	0
SE180-11 (pWHM3)	4	0	0	0
SE180-11 (pSE290)	4	87	208	0,42
SE180-11 (pSE291)	4	106	185	0,57
SE180-11 (pSE292)	4	91	231	0,40
SE180-11 (pSE293)	4	123	180	0,68
SE180-11 (pSE294)	4	68	129	0,53
SE180-11 (pSE295)	4	217	271	0,80
SE180-11 (pSE296)	1	135	186	0,73
SE180-11 (pSE297)	1	148	221	0,67

9. Konštrukcia 5' delečných mutantov

Ako je vysvetlené v časti 5.1 vyššie, obsahuje nukleotídová sekvencia *S. avermitilis* uvedená na Obrázku 1 (SEQ ID č:1) štyri rôzne GTG kodóny v bp pozíciách 42, 174, 177 a 180, ktoré sú potenciálnymi štartovacími miestami. Táto časť opisuje konštrukciu mnohopočetných delécií 5' oblasti aveC ORF (Obrázok 1; SEQ ID č:1), aby sa definovalo, ktorý z týchto kodónov môže účinkovať ako štartovacie miesto v aveC ORF na expresiu proteínu.

Fragmenty aveC génu rôzne deletované na 5' konci boli izolované z chromozomálnej DNA *S. avermitilis* pomocou PCR amplifikácie. PCR priméry boli navrhnuté na základe aveC DNA sekvencie a boli dodané spoločnosťou Genosys Biotechnologies, Inc. Pravostranné priméry mali sekvenciu: 5'-AACCCATCCGAGCCGCTC-3' (SEQ ID č:16) (D1F1); 5'-TCGGCCTGCCAACGAAC-3' (SEQ ID č:17) (D1F2); 5'-CCAACGAACGTGTAGTAG-3' (SEQ ID č:18) (D1F3); a 5'-TGCAGGCGTACGTGTTTCAGC-3' (SEQ ID č:19) (D2F2). Ľavostranné priméry mali sekvenciu: 5'-CATGATCGCTGAACCGA-3' (SEQ ID č:20); 5'-CATGATCGCTGAACCGAGGA-3' (SEQ ID č:21); a 5'-

AGGAGTGTGGTGCCTCTGGA-3' (SEQ ID č:22). PCR reakcia bola uskutočnená, ako je opísané v časti 8,3 vyššie.

PCR produkty boli separované elektroforeticky na 1% agarózovom géli a boli detekované jednotlivé DNA bandy s veľkosťou buď zhruba 1,0 Kb alebo 1,1 Kb. PCR produkty boli purifikované z gélu a ligované s 25 ng linearizovaného pCR2.1 vektoru (Invitrogén) v 1:10 molárnom vektor/inzert pomere podľa inštrukcií výrobcu. Ligačné zmesi boli použité na transformáciu One Shot™ kompetentných E. coli buniek (Invitrogén) podľa inštrukcií výrobcu. Plazmidová DNA bola izolovaná z ampicilín rezistentných transformantov a prítomnosť inzertu bola potvrdená restriktčnou analýzou a analýzou sekvencie DNA. Tieto plazmidy boli označené ako pSE190 (získaný s primérom D1F1), pSE191 (získaný s primérom D1F2), pSE192 (získaný s primérom D1F3) a pSE193 (získaný s primérom D2F2).

DNA inzerty boli natrávené pomocou BamHI/XbaI, separované elektroforeticky na 1% agarózovom géli, a oddelene ligované s transportným vektorom pWHM3, ktorý bol natrávený pomocou BamHI/XbaI v celkovej DNA koncentrácii 1 µg v 1:5 molárnom vektor/inzert pomere. Ligačné zmesi boli použité na transformáciu kompetentných E. coli DH5α buniek. Plazmidová DNA bola izolovaná z ampicilín rezistentných transformantov a prítomnosť inzertu bola potvrdená restriktčnou analýzou. Tieto plazmidy, ktoré boli označené ako pSE194 (D1F1), pSE195 (D1F2), pSE196 (D1F3) a pSE197 (D2F2) boli každý oddelene transformované do kmeňa E. coli DM1, plazmidová DNA bola izolovaná z ampicilín rezistentných transformantov a prítomnosť inzertu bola potvrdená restriktčnou analýzou. Táto DNA bola použitá na transformáciu protoplastov kmeňa S.

avermitilis SE180-11. Tio^rstreptón rezistentné transformanty kmeňa SE180-11 boli izolované, bola určená prítomnosť rezistencie na erytromycín, a Tio^r Erm^r transformanty boli analyzované HPLC analýzou fermentačných produktov za účelom určenia, ktoré GTG miesta bola potrebné na aveC expresiu. Výsledky ukazujú, že GTG kodón v pozícii 42 môže byť eliminovaný bez ovplyvnenia aveC exprese, pretože pSE194, pSE195 a pSE196, z ktorých každý je bez GTG miesto v pozícii 42, ale každý obsahuje tri GTG miesta v pozíciách 174, 177 a 180, boli všetky schopné reštaurovať normálnu produkciu avermektínov po transformácii do SE180-11. Normálna produkcia avermektínov nebola reštaurovaná transformáciou kmeňa SE180-11 pomocou pSE197, ktorý je bez všetkých štyroch GTG miest (Tabuľka 5).

Tabuľka 5

Kmeň <i>S. avermitilis</i> (transformujúci plazmid)	n testovaných transformantov	Relatívny c B2	Relatívny c B1	Priemerný pomer B2:B1
SE180-11 (žiadny)	6	0	0	0
SE180-11 (pWHM3)	6	0	0	0
SE180-11 (pSE186)	6	241	152	1,58
SE180-11 (pSE194)	6	35	15	2,43
SE180-11 (pSE195)	6	74	38	1,97
SE180-11 (pSE196)	6	328	208	1,58
SE180-11 (pSE197)	6	0	0	0

10. Klonovanie aveC homológu zo *S. hygroscopicus* a *S. griseochromogenes*

Predkladaný vynález umožňuje identifikovať a klonovať aveC homológne gény z iných avermektín alebo milbemycín produkujúcich druhov *Streptomyces*. Napríklad bola hybridizovaná s 1,2 Kb aveC próbou zo *S. avermitilis* kozmidová knižnica genomickej DNA zo *S. hygroscopicus* (FERM BP-1901), ako je opísané vyššie. Bolo identifikovaných niekoľko kozmidových

klonov, ktoré silno hybridizujú. Chromozomálna DNA bola izolovaná z týchto kozmidov a bol identifikovaný 4,9 Kb KpnI fragment, ktorý hybridizoval s aveC próbou. Tato DNA bola sekvenovaná a bol identifikovaný ORF (SEQ ID č:3) majúci významnú homológiu s aveC ORF *S. avermitilis*. Amínokyselinová sekvencia (SEQ ID č:4) odvodená z aveC homológneho ORF *S. hygroscopicus* je uvedená na Obrázku 6.

Navyše bola hybridizovaná s 1,2 Kb aveC próbou zo *S. avermitilis* kozmidová knižnica genomickej DNA zo *S. griseochromogenes*, ako je opísané vyššie. Bolo identifikovaných niekoľko kozmidových klonov, ktoré silno hybridizujú. Chromozomálna DNA bola izolovaná z týchto kozmidov a bol identifikovaný 5,4 Kb PstI fragment, ktorý hybridizoval s aveC próbou. Táto DNA bola sekvenovaná a bol identifikovaný aveC homológny čiastočný ORF majúci významnú homológiu s aveC ORF *S. avermitilis*. Odvodená čiastočná amínokyselinová sekvencia (SEQ ID č:5) je uvedená na Obrázku 6.

DNA a amínokyselinová sekvenčná analýza aveC homógu zo *S. hygroscopicus* a *S. griseochromogenes* ukazujú, že tieto oblasti sa delia o významnú homológiu (zhruba 50% sekvenčná identita na amínokyselinovej úrovni), ako voči sebe tak aj s génovými produktami aveC ORF *S. avermitilis* a AveC (Obrázok 6).

11. Konštrukcia plazmidu s aveC génom za ermE promotorom

1,2 Kb aveC ORF z pSE186 bol subklonovaný v pSE34, čo je transportný vektor pWHM3 majúci 300 bp ermE promotor inzerovaný ako KpnI/BamHI fragment v KpnI/BamHI mieste pWHM3 (pozri Ward et al., 1986, Mol gen Genet 203:468-478). PSE186

bol natrávený pomocou BamHI a HindIII, natrávená zmes bola podrobená elektroforéze a 1,2 Kb fragment bol izolovaný z agarózového gélu a ligovaný s pSE34, ktorý bol natrávený pomocou BamHI a HindIII. Ligačná zmes bola transformovaná do kompetentných *E. coli* DH5 α buniek podľa inštrukcií výrobcu. Plazmidová DNA bola izolovaná z ampicilín rezistentných transformantov a prítomnosť 1,2 Kb inzertu bola potvrdená restriktčnou analýzou. Tento plazmid, ktorý bol označený ako pSE189 bol transformovaný do kmeňa *E. coli* DM1 a plazmidová DNA bola izolovaná z ampicilín rezistentných transformantov. Protoplasty kmeňa *S. avermitilis* 1100-SC38 boli transformované pomocou pSE189. Tiostreptón rezistentné transformanty kmeňa 1100-SC38 boli izolované a analyzované HPLC analýzou fermentačných produktov.

Transformanty kmeňa 1100-SC38 obsahujúce pSE189 mali narušené pomery produkovaných avermektín cyklohexyl-B2:avermektín-B1 (zhruba 3:1) v porovnaní s kmeňom 1100-SC38 (zhruba 34:1) a celková produkcia avermektínov sa zvýšila približne 2,4 krát v porovnaní s kmeňom 1100-SC38 transformovaným pomocou pSE119 (Tabuľka 6).

PSE189 bola tiež transformovaná do protoplastov divokého typu kmeňa *S. avermitilis*. Tiostreptón rezistentné transformanty boli izolované a analyzované HPLC analýzou fermentačných produktov. Celkové avermektíny produkované divokým typom *S. avermitilis* transformovaným pomocou pSE189 sa zvýšili približne 2,2 krát v porovnaní s divokým kmeňom *S. avermitilis* transformovaným pomocou pSE119 (Tabuľka 6).

Tabuľka 6

Kmeň <i>S. avermitilis</i> (transformujúci plazmid)	n testovaných transformantov	Relatívny B2	Relatívny B1	Relatívne celkové avermektíny	Priemerný pomer B2:B1
1100-SC38	6	155	4,8	176	33,9
1100-SC38 (pSE119)	9	239	50,3	357	4,7
1100-SC38 (pSE189)	16	546	166	849	3,3
Divoký typ	6	59	42	113	1,41
Divoký typ (pSE119)	6	248	151	481	1,64
Divoký typ (pSE189)	5	545	345	1,071	1,58

12. Chimerický plazmid obsahujúci sekvencie z *aveC* ORF *S. avermitilis* aj *aveC* homológy *S. hygroscopicus*

Hybridný plazmid označený ako pSE350 bol skonštruovaný, aby obsahoval 564 bp časť *aveC* homológ *S. hygroscopicus* nahradzujúcu 564 homológnu časť *aveC* ORF *S. avermitilis* (Obrázok 7) nasledujúcim spôsobom. PSE350 bol skonštruovaný za použitia *Bsa*AI restriktčného miesta, ktoré je konzervované v obidvoch sekvenciách (*aveC* pozícia 225) a *Kpn*I restriktčnom mieste, ktoré je prítomné v *aveC* géne *S. avermitilis* (*aveC* pozícia 810). *Kpn*I miesto bolo začlenené do DNA *S. hygroscopicus* pomocou PCR za použitia pravostranného priméru 5'-CTTCAGGTGTACGTGTTTCG-3' (SEQ ID č:23) a ľavostranného priméru 5'-GAACTGGTACCAGTGCCC-3' (SEQ ID č:24) (dodané spoločnosťou Genosys Biotechnologies) za použitia PCR podmienok opísaných v časti 7.1.10 vyššie. PCR produkt bol natrávený pomocou *Bsa*AI a *Kpn*I, fragmenty boli separované na 1% agarózovom géli a 564 bp *Bsa*AI/*Kpn*I fragment bol izolovaný z gélu. pSE179 (Opísaný v časti 7.1.10 vyššie) bol natrávený pomocou *Kpn*I a *Hind*III, fragmenty boli separované elektroforeticky na 1% agarózovom géli a fragment s veľkosťou zhruba 4,5 Kb bol izolovaný z gélu. pSE179 bol natrávený

pomocou HindIII a BsaAI, fragmenty boli separované elektroforeticky na 1% agarózovom géli a BsaAI/HindIII fragment s veľkosťou zhruba 0,2 Kb bol izolovaný z gélu. HindIII/KpnI fragment s veľkosťou zhruba 4,5 Kb, BsaAI/HindIII fragment s veľkosťou zhruba 0,2 Kb a BsaAI/KpnI fragment s veľkosťou zhruba 564 bp zo *S. hygroscopicus* boli spolu ligované v trojcestnej ligácii a ligačná zmes bola transformovaná do kompetentných *E.coli* DH5 α buniek. Plazmidová DNA bola izolovaná z ampicilín rezistentných transformantov a prítomnosť správneho inzertu bola potvrdená restričnou analýzou za použitia KpnI a AvaI. Plazmid bol natrávený pomocou HindIII a XbaI, aby došlo na uvoľnenie inzertu s veľkosťou 1,2 Kb, ktorý bol potom ligovaný s pWHM3, ktorý bol natrávený pomocou HindIII a XbaI. Ligačná zmes bola transformovaná do kompetentných *E.coli* DH5 α buniek. Plazmidová DNA bola izolovaná z ampicilín rezistentných transformantov a prítomnosť správneho inzertu bola potvrdená restričnou analýzou za použitia HindIII a AvaI. Plazmidová DNA bola transformovaná do *E.coli* DM1, plazmidová DNA bola izolovaná z ampicilín rezistentných transformantov a prítomnosť správneho inzertu bola potvrdená restričnou analýzou a analýzou sekvencie DNA. Plazmid bol označený ako pSE350 a použitý na transformáciu protoplastov kmeňa SE180-11 *S. avermitilis*. Tio^r streptón rezistentné transformanty kmeňa SE180-11 boli izolované, bola určená prítomnosť rezistencie na erytromycín, a Tio^r Erm^r transformanty boli analyzované HPLC analýzou fermentačných produktov. Výsledky ukazujú, že transformanty obsahujúce *S. avermitilis*/*S. hygroscopicus* hybridný plazmid majú priemerný B2:B1 pomer zhruba 109:1 (Tabuľka 7).

Tabuľka 7

Kmeň S. avermitilis (transformujúci plazmid)	n testovaných transformantov	Relatívny c B2	Relatívny c B1	Priemerný pomer B2:B1
SE180-11 (žiadny)	8	0	0	0
SE180-11 (pWHM3)	8	0	0	0
SE180-11 (pSE350)	16	233	2	109

Uloženie biologického materiálu

Nasledujúci biologický materiál bol uložený v Americkej zbierke typových kultúr (ATCC), Parklawn Drive, Rockville, MD, 20852, USA, 29. ledna 1998 a boli mu priradené nasledujúce prístupové čísla:

Plazmid	Prístupové číslo
Plazmid pSE180	209605
Plazmid pSE186	209604

Všetky patenty, patentové prihlášky a publikácie vyššie citované sú týmto začlenené ako referencie v celej svojej šírke.

Predkladaný vynález nie je obmedzený rozsahom špecifických foriem vynálezu tu opísaných, ktoré sú zamýšľané ako jednotlivé ilustrácie jednotlivých aspektov vynálezu a funkčne ekvivalentné metódy a komponenty sú v rozsahu vynálezu. Rôzne modifikácie vynálezu, navyše k tým, ktoré boli uvedené a opísané, budú skutočne zrejmé osobám pohybujúcim sa v odbore z predchádzajúceho opisu a sprievodných obrázkov. Takéto modifikácie sú považované za patriace do rozsahu priložených patentových nárokov.

P A T E N T O V É N Á R O K Y

1. Polynukleotídová molekula obsahujúca nukleotídovú sekvenciu aveC alely *Streptomyces avermitilis*, alebo AveC génový produkt-kódujúcu sekvenciu plazmidu pSE186 (ATCC 209604), alebo nukleotídovú sekvenciu aveC ORF *S. avermitilis*, ako je uvedené na Obrázku 1 (SEQ ID č. 1), alebo jej degenerovaný variant, ale táto nukleotídová sekvencia ďalej obsahuje aspoň prvú mutáciu kódujúcu aminokyselinovú substitúciu zo serínu na treonín v aminokyselinovom rezíduu aveC génového produktu korešpondujúcim s aminokyselinovou pozíciou 138 v SEQ ID č. 2, a druhú mutáciu kódujúcu aminokyselinovú substitúciu z alanínu na fenylalanín v aminokyselinovom rezíduu aveC génového produktu korešpondujúcim s aminokyselinovou pozíciou 139 v SEQ ID č. 2, takže bunky kmeňa *S. avermitilis* ATCC 53692, v ktorých bola divoká aveC alela inaktivovaná, a ktoré exprimujú polynukleotídovú molekulu obsahujúcu mutovanú nukleotídovú sekvenciu, produkujú pomer triedy 2:1 avermektínov, ktorý je znížený v porovnaní s pomerom triedy 2:1 avermektínov produkovaným bunkami kmeňa *S. avermitilis* ATCC 53692, ktorý exprimuje len divoký typ aveC alely.
2. Polynukleotídová molekula podľa patentového nároku 1, kde triedou 2:1 avermektínov sú cyklohexyl B2:cyklohexyl B1 avermektíny.
3. Polynukleotídová molekula podľa patentového nároku 2, kde znížený pomer cyklohexyl B2:cyklohexyl B1 avermektínov je 0,75:1 alebo menej.
4. Rekombinantný vektor obsahujúci polnukleotídovú molekulu podľa patentového nároku 1.

5. Rekombinantný vektor schopný mutovať aveC alelu *Streptomyces avermitilis* začlenením aspoň prvej mutácie kódujúcej amínokyselinovú substitúciu zo serínu na treonín v amínokyselinovom rezíduu aveC génového produktu korešpondujúcim s amínokyselinovou pozíciou 138 v SEQ ID č. 2, a druhej mutácie kódujúcej amínokyselinovú substitúciu z alanínu na fenylalanín v amínokyselinovom rezíduu aveC génového produktu korešpondujúcim s amínokyselinovou pozíciou 139 v SEQ ID č. 2, obsahujúci polynukleotídovú molekulu majúcu nukleotídovú sekvenciu kódujúcu takú mutáciu.
6. Rekombinantný vektor podľa patentového nároku 5 obsahujúci polynukleotídovú molekulu podľa patentového nároku 1.
7. Hostiteľská bunka *Streptomyces* obsahujúca polynukleotídovú molekulu podľa patentového nároku 1 alebo rekombinantný vektor podľa patentového nároku 4 alebo 5.
8. Spôsob prípravy nového kmeňa *S. avermitilis* zahŕňajúci bunky, ktoré exprimujú mutovanú aveC alelu. Ktorá produkuje znížený pomer 2:1 avermektínov v porovnaní s bunkami rovnakého kmeňa *S. avermitilis*, ktorý exprimuje len divoký typ aveC alely, a tento spôsob zahŕňa: (a) vloženie polynukleotídovej molekuly do bunky kmeňa *S. avermitilis*, a táto polynukleotídová molekula nesie mutovanú aveC alelu alebo jej degenerovaný variant, ktorá kóduje AveC génový produkt obsahujúci aspoň prvú mutáciu kódujúcu amínokyselinovú substitúciu zo serínu na treonín v amínokyselinovom rezíduu aveC génového produktu korešpondujúcim s amínokyselinovou pozíciou 138 v SEQ ID č. 2, a druhú mutáciu kódujúcu amínokyselinovú substitúciu z alanínu na fenylalanín v amínokyselinovom rezíduu aveC génového produktu korešpondujúcim s

amínokyselinovou pozíciou 139 v SEQ ID č. 2, kde expresia zmieneného génového produktu vedie na zníženie pomeru triedy 2:1 avermektínov produkovaného bunkami kmeňa *S. avermitilis* exprimujúcimi mutovanú *aveC* alelu alebo jej degenerovaný variant, v porovnaní s bunkami rovnakého kmeňa *S. avermitilis*, ktorý exprimuje len divoký typ *aveC* alely a výber buniek, ktoré produkujú avermektíny v zníženom pomere triedy 2:1 produkovanom bunkami kmeňa, ktorý exprimuje len divoký typ *aveC* alely; (b) vloženie jednej alebo viacerých polynukleotídových molekúl do bunky kmeňa *S. avermitilis*, a tieto polynukleotídové molekuly sú schopné spôsobiť jednu alebo viacej mutácií v *aveC* alele, takže bunky kódujú *AveC* génový produkt obsahujúci aspoň prvú amínokyselinovú substitúciu zo serínu na treonín v amínokyselinovom rezíduu korešpondujúcim s amínokyselinovou pozíciou 138 v SEQ ID č. 2, a druhú amínokyselinovú substitúciu z alanínu na fenylalanín v amínokyselinovom rezíduu korešpondujúcim s amínokyselinovou pozíciou 139 v SEQ ID č. 2, kde expresia zmieneného génového produktu vedie na zníženie pomeru triedy 2:1 avermektínov produkovaného bunkami kmeňa *S. avermitilis* exprimujúcimi mutovanú *aveC* alelu v porovnaní s bunkami rovnakého kmeňa *S. avermitilis*, ktorý exprimuje len divoký typ *aveC* alely, a výber buniek, ktoré produkujú avermektíny v zníženom pomere triedy 2:1 produkovanom bunkami kmeňa, ktorý exprimuje len divoký typ *aveC* alely.

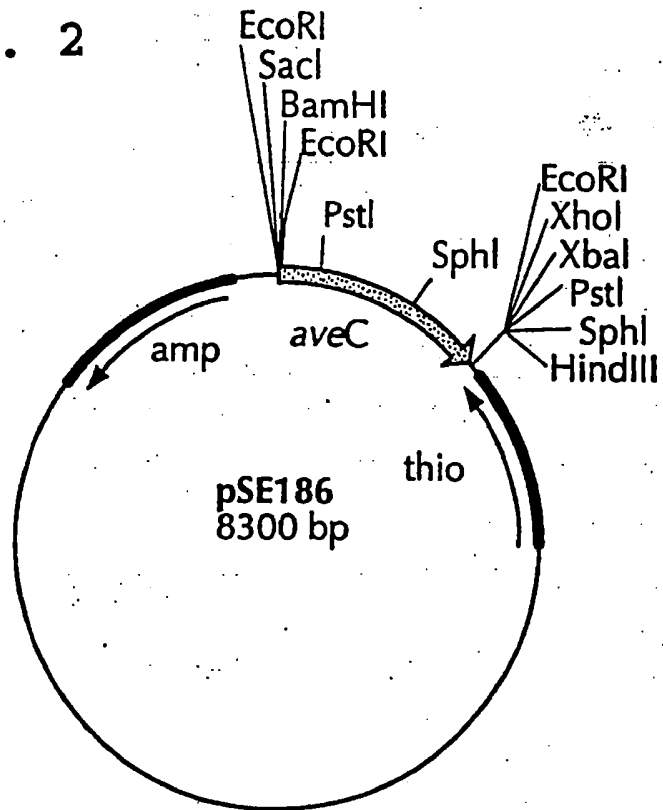
9. Spôsob podľa patentového nároku 8, kde triedou 2:1 avermektínov sú cyklohexyl B2:cyklohexyl B1 avermektíny.
10. Spôsob podľa patentového nároku 9, kde znížený pomer cyklohexyl B2:cyklohexyl B1 avermektínov je 0,75 alebo menej.

11. Bunka *Streptomyces avermitilis* obsahujúca mutovanú aveC alelu obsahujúcu prvú mutáciu kódujúcu amínokyselinovú substitúciu zo serínu na treonín v amínokyselinovom rezíduu korešpondujúcim s amínokyselinovou pozíciou 138 v SEQ ID č. 2, a druhú mutáciu kódujúcu amínokyselinovú substitúciu z alanínu na fenylalanín v amínokyselinovom rezíduu korešpondujúcim s amínokyselinovou pozíciou 139 v SEQ ID č. 2.
12. Bunky podľa patentového nároku 11, ktoré produkujú znížený pomer triedy 2:1 avermektínov v porovnaní s bunkami rovnakého kmeňa *S. avermitilis*, ktorý exprimuje len divoký typ aveC alely.
13. Bunka podľa patentového nároku 12, kde triedou 2:1 avermektínov sú cyklohexyl B2:cyklohexyl B1 avermektíny.
14. Bunka podľa patentového nároku 13, kde znížený pomer cyklohexyl B2:cyklohexyl B1 avermektínov je 0,75:1 alebo menej.
15. Postup produkcie avermektínov zahŕňajúci kultiváciu buniek podľa patentového nároku 11 v kultivačnom médiu za podmienok, ktoré umožňujú alebo indukujú produkciu avermektínov, a získanie zmienенých avermektínov z kultúry.
16. Zloženie cyklohexyl B2:cyklohexyl B1 avermektínov produkovaných bunkami *Streptomyces avermitilis* zahŕňajúce cyklohexyl B2:cyklohexyl B1 avermektíny v pomere 0,75:1 alebo menej v médiu, v ktorom boli bunky kultivované.
17. Zloženie cyklohexyl B2:cyklohexyl B1 avermektínov produkovaných bunkami kmeňa *Streptomyces avermitilis*, ktorý exprimuje mutovanú aveC alelu, ktorá kóduje génový produkt, ktorý vedie na zníženie pomeru triedy 2:1 cyklohexyl B2:cyklohexyl B1 avermektínov produkovaného bunkami v porovnaní s bunkami rovnakého kmeňa *S.*

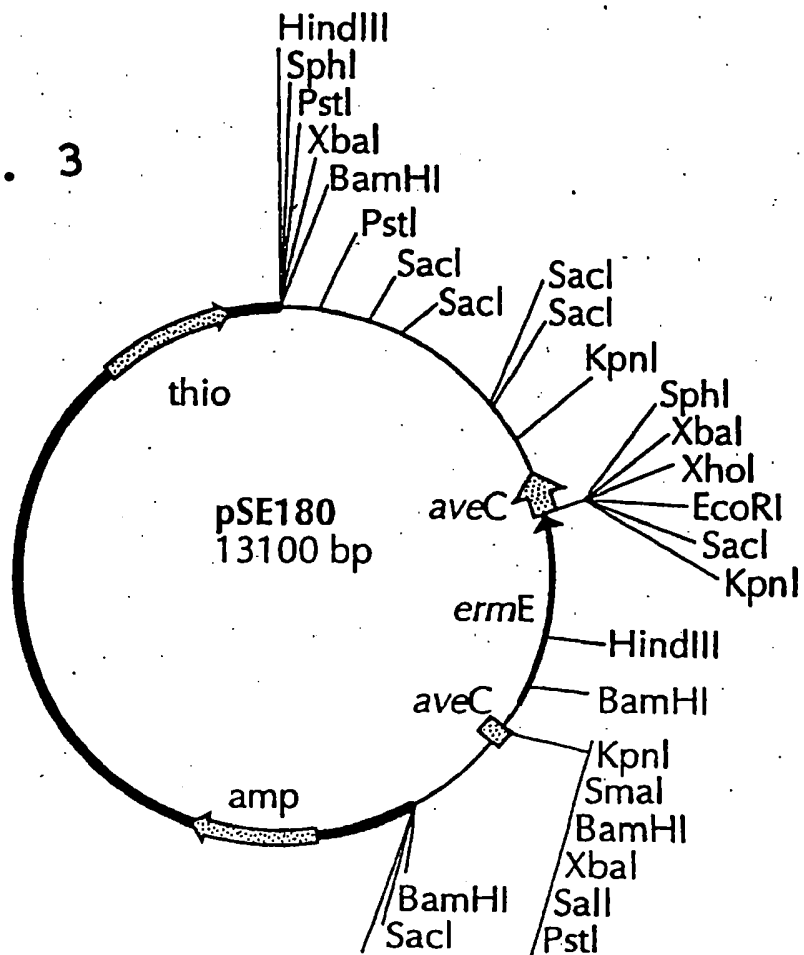
avermilis, ktorý neexprimuje mutovanú aveC alelu, ale exprimuje len divoký typ aveC alely, a toto zloženie zahŕňa cyklohexyl B2:cyklohexyl B1 avermektíny v pomere 0,75:1 alebo menej v kultivačnom médiu, v ktorom boli bunky kultivované.

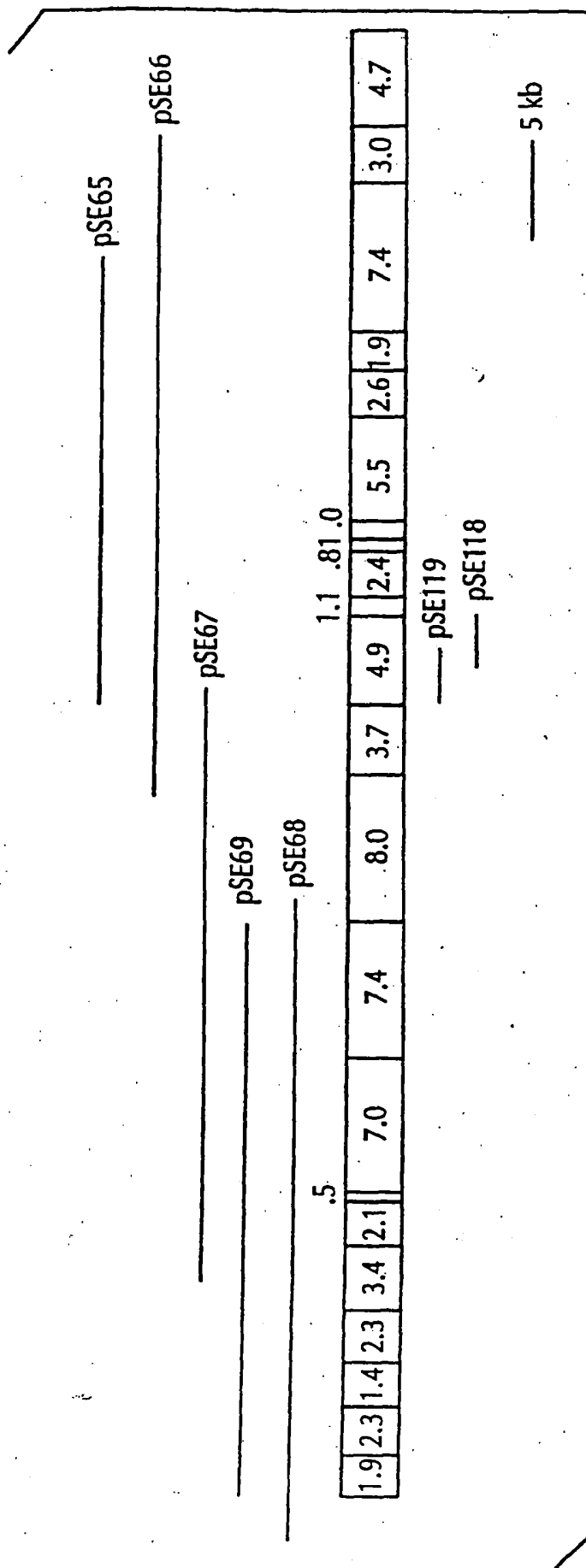
[illegible]

Obr. 2

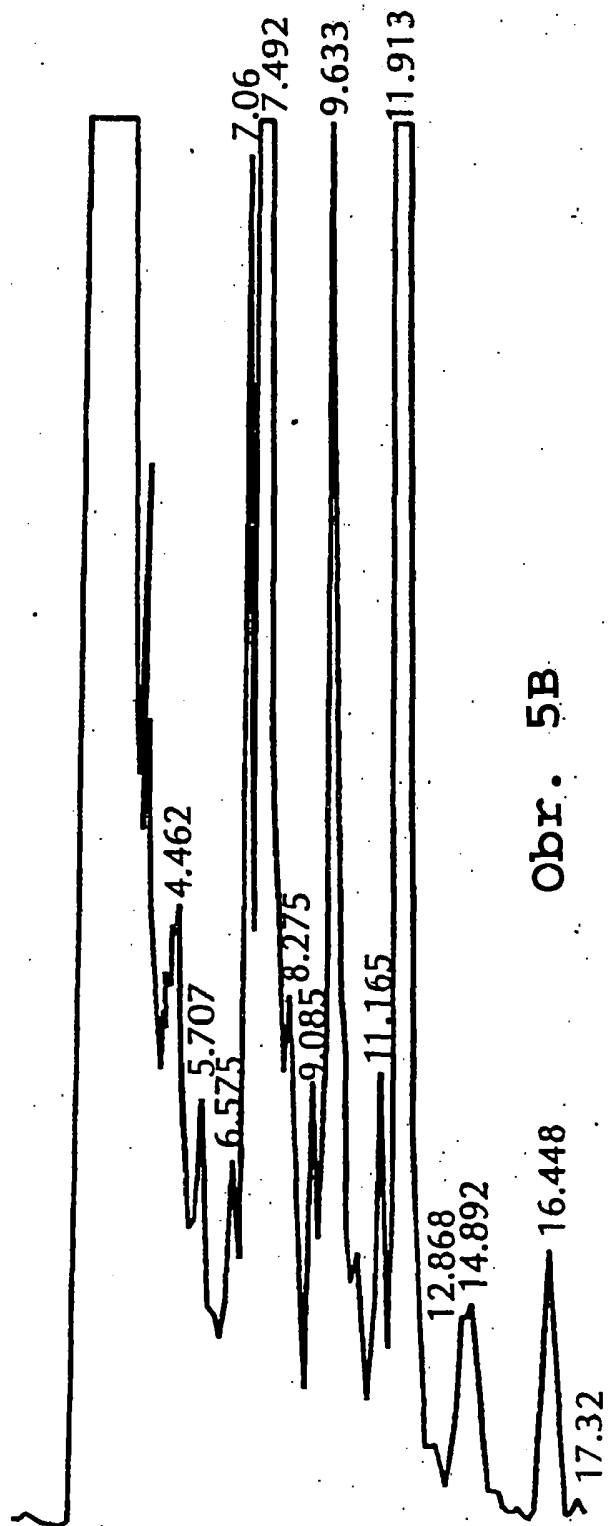
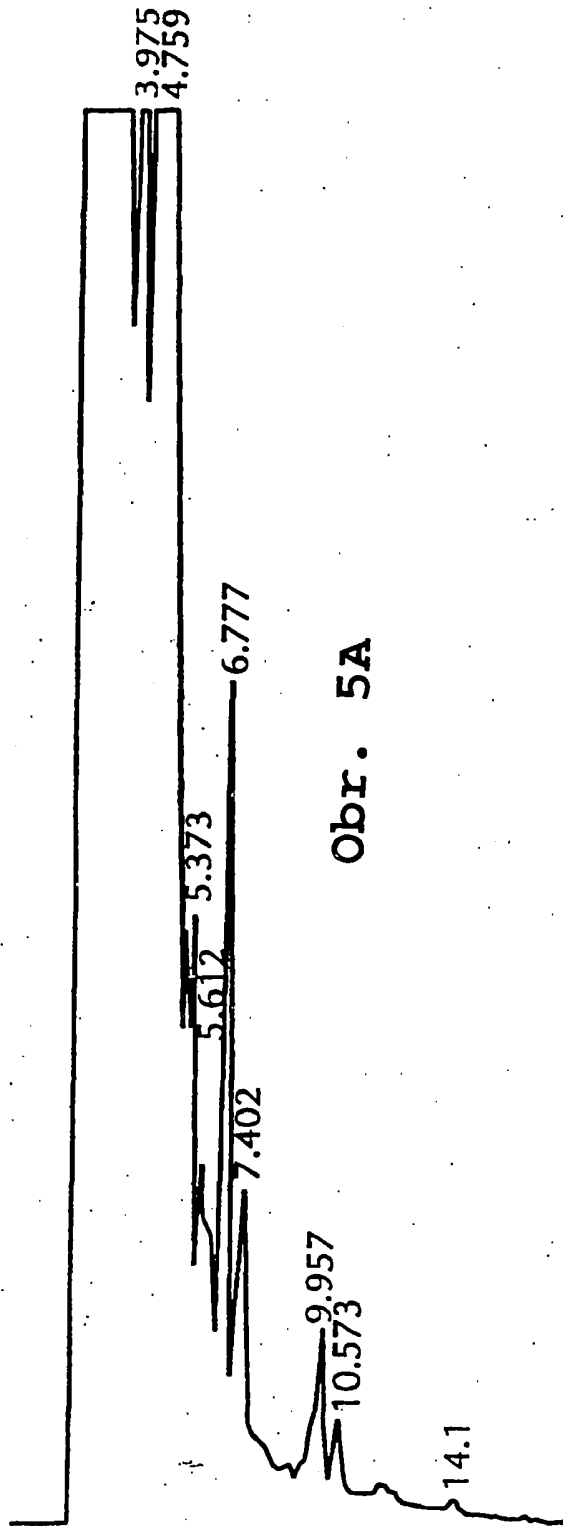


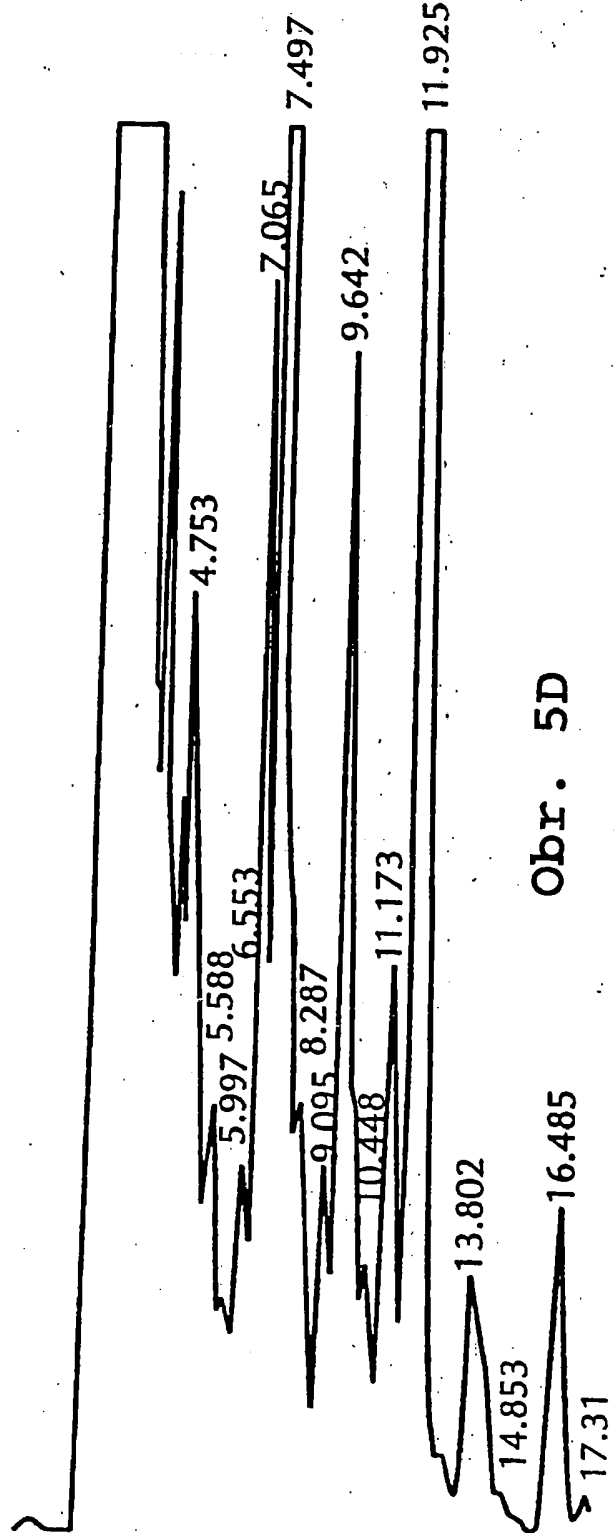
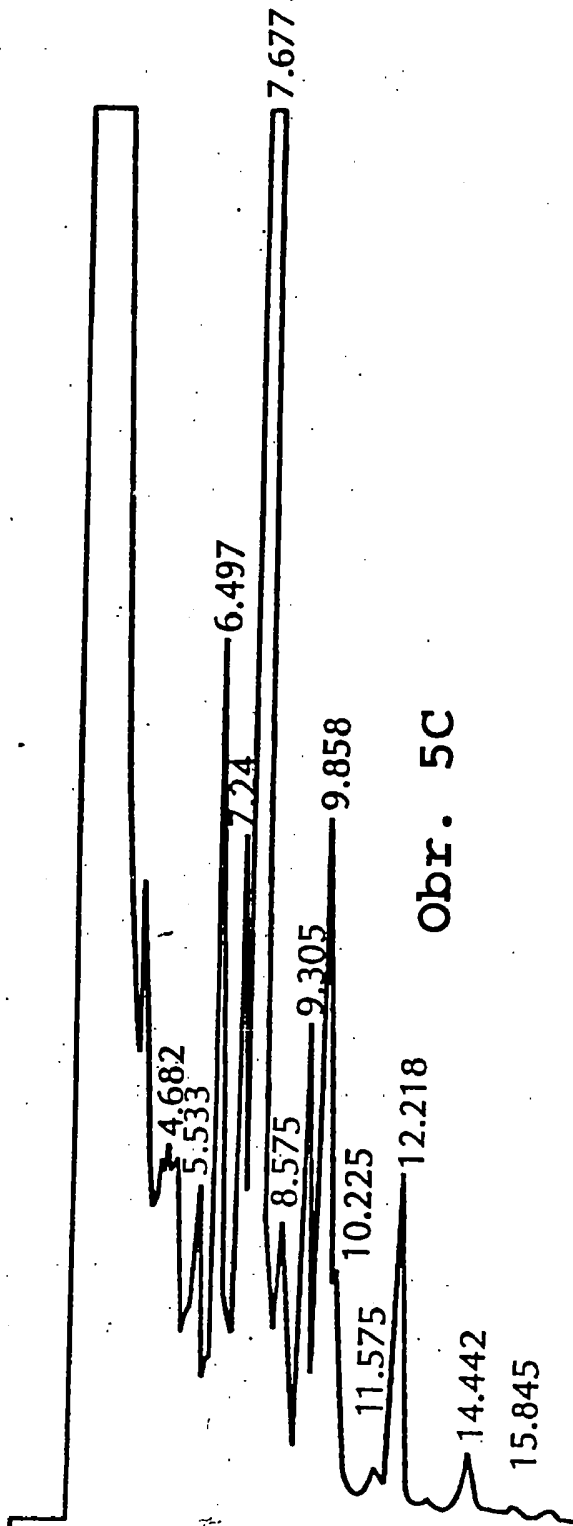
Obr. 3





Obr. 4





6/7

Obr. 6

S. ave
S. gri
S. hyg
Cons

.....
.....
VFTLP

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

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

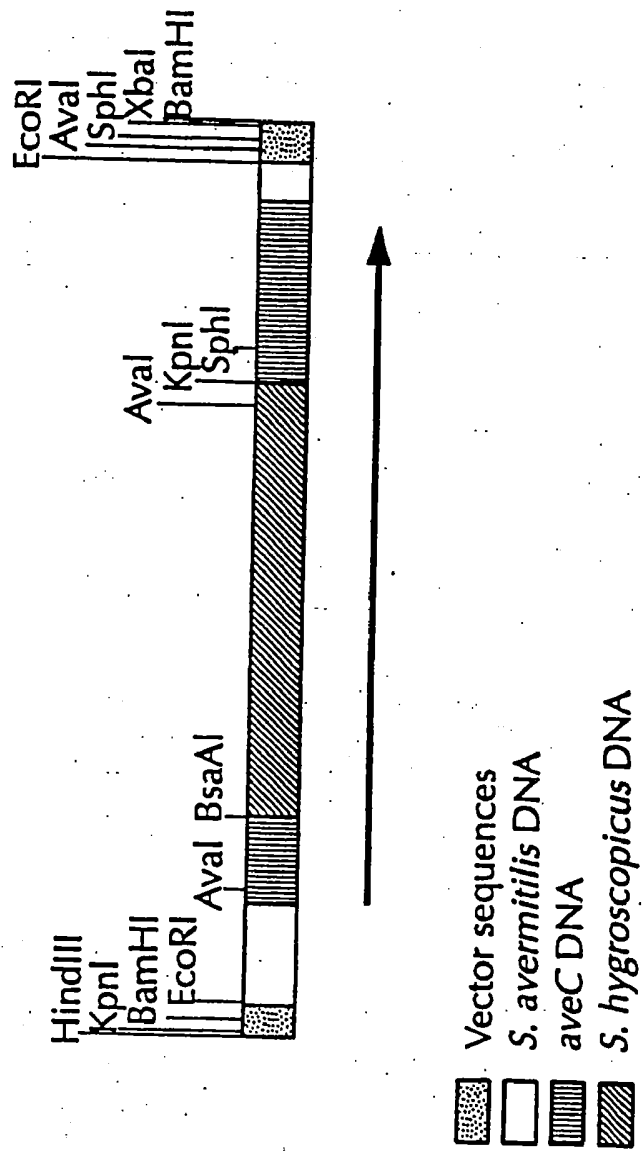
	101		150
S. ave	SVLVSNASVW GAVGSWGPYV PGWQGAGPGA EAEMPLASAS VCMSALIVTV		
S. gri	PVLMANTHVW GAVGSWGPYV PGWRGLPPGK EAELPLVTFS LGSTVLLGVL		
S. hyg	PVLASNUNVF GAVASWGPYV PGWQGAGAHQ EAELPLATLS ICMTAMMAAV		
Cons	pVL-sN--Vw GAVgSWGPYV PGWqGagpg- EAElPlat-S -cmtal---v		

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

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

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

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



Obr. 7

Sekvence

<110> PFIZER PRODUCTS INC.

<120> Gén Streptomyces avermitilis riadiaci pomer B2:B1 avermektinov

<130> PC10649A

<140> PC10649

<141> 1999-08-12

<150> 60/074, 636

<151> 1998-02-13

<150> PCT/IB99/00130

<151> 1999-01-25

<160> 25

<170> PatentIn Ver. 2.1

<210> 1

<211> 1229

<212> DNA

<213> Streptomyces avermitilis

<220>

<221> CDS

<222> (174)..(1085)

<400> 1

tcacgaaacc ggacacacca cacacacgaa ggtgagacag cgtgaaccca tccgagccgc 60

tgggcctgcc caacgaacgt gtagtagaca cccgaccgtc cgatgccacg ctctcaccgc 120

aggccggcct gaacaggtca ggagcgtgc cccgtgaact gctgtcgttg ccg gtg 176

Val

1

gtg gtg tgg gcc ggg gtc ggc ctg ctg ttt ctg gcc ctg cag gcg tac 224

Val Val Trp Ala Gly Val Gly Leu Leu Phe Leu Ala Leu Gln Ala Tyr

5

10

15

gtg ttc agc cgc tgg gcg gcc gac ggt ggc tac cgg ctg atc gag acg 272

Val Phe Ser Arg Trp Ala Ala Asp Gly Gly Tyr Arg Leu Ile Glu Thr

20

25

30

gcg ggc cag ggt cag ggc ggc agc aag gat acg ggg act acc gat gtg	320
Ala Gly Gln Gly Gln Gly Gly Ser Lys Asp Thr Gly Thr Thr Asp Val	
35 40 45	
gtc tat ccc gtg att tcc gtc gtc tgc atc acc gcc gcg gcg gcg tgg	368
Val Tyr Pro Val Ile Ser Val Val Cys Ile Thr Ala Ala Ala Ala Trp	
50 55 60 65	
ctc ttc cgg agg tgc cgt gtc gaa cga cgg ctg ctg ttc gac gcc ctt	416
Leu Phe Arg Arg Cys Arg Val Glu Arg Arg Leu Leu Phe Asp Ala Leu	
70 75 80	
ctc ttc ctc ggg ctg ctg ttc gcg agc tgg cag agc ccg ctc atg aac	464
Leu Phe Leu Gly Leu Leu Phe Ala Ser Trp Gln Ser Pro Leu Met Asn	
85 90 95	
tgg ttc cat tcc gtt ctc gtc tcc aac gcg agt gtg tgg ggc gcg gtg	512
Trp Phe His Ser Val Leu Val Ser Asn Ala Ser Val Trp Gly Ala Val	
100 105 110	
ggt tcc tgg ggt ccg tat gtg ccc ggc tgg cag ggg gcg ggc ccg ggt	560
Gly Ser Trp Gly Pro Tyr Val Pro Gly Trp Gln Gly Ala Gly Pro Gly	
115 120 125	
gcg gag gcg gaa atg ccg ctg gcg tcg gcc tcc gtc tgc atg tcg gct	608
Ala Glu Ala Glu Met Pro Leu Ala Ser Ala Ser Val Cys Met Ser Ala	
130 135 140 145	
ctg atc gtc acc gtg ctg tgc agc aag gca ctg ggg tgg atc aag gcc	656
Leu Ile Val Thr Val Leu Cys Ser Lys Ala Leu Gly Trp Ile Lys Ala	
150 155 160	
cgc cgg ccg gca tgg cgg acc tgg cgg ctg gtc ctg gcc gtg ttc ttc	704
Arg Arg Pro Ala Trp Arg Thr Trp Arg Leu Val Leu Ala Val Phe Phe	
165 170 175	
atc ggc atc gtg ctc ggt ctg tcc gag ccg ctg ccg tcc gcc tcc ggg	752
Ile Gly Ile Val Leu Gly Leu Ser Glu Pro Leu Pro Ser Ala Ser Gly	
180 185 190	
atc agc gta tgg gcc aga gcg ctg ccc gag gtg acc ttg tgg agt ggc	800
Ile Ser Val Trp Ala Arg Ala Leu Pro Glu Val Thr Leu Trp Ser Gly	
195 200 205	
gag tgg tac cag ttc ccc gtg tat cag gcg gtc ggt tcc ggc ctg gtc	848
Glu Trp Tyr Gln Phe Pro Val Tyr Gln Ala Val Gly Ser Gly Leu Val	
210 215 220 225	

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

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

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

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

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

gttcagggca ggtcggagga gacggagaag gggaggcgac cggagttccg gtcacctccc 1145

ctttgtgcat ggggtggacgg ggatcacgct cccatggcgg cgggctcctc cagacgcacc 1205

acactcctcg gttcagcgat catg 1229

<210> 2

<211> 303

<212> PRT

<213> Streptomyces avermitilis

<400> 2

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

115	120	125
Gly Ala Glu Ala Glu Met Pro Leu Ala Ser Ala Ser Val Cys Met Ser		
130	135	140
Ala Leu Ile Val Thr Val Leu Cys Ser Lys Ala Leu Gly Trp Ile Lys		
145	150	155
Ala Arg Arg Pro Ala Trp Arg Thr Trp Arg Leu Val Leu Ala Val Phe		160
	165	170
Phe Ile Gly Ile Val Leu Gly Leu Ser Glu Pro Leu Pro Ser Ala Ser		175
	180	185
Gly Ile Ser Val Trp Ala Arg Ala Leu Pro Glu Val Thr Leu Trp Ser		190
195	200	205
Gly Glu Trp Tyr Gln Phe Pro Val Tyr Gln Ala Val Gly Ser Gly Leu		
210	215	220
Val Cys Cys Met Leu Gly Ser Leu Arg Phe Phe Arg Asp Glu Arg Asp		
225	230	235
Glu Ser Trp Val Glu Arg Gly Ala Trp Arg Leu Pro Gln Arg Ala Ala		240
	245	250
Asn Trp Ala Arg Phe Leu Ala Val Val Gly Gly Val Asn Ala Val Met		255
	260	265
Phe Leu Tyr Thr Cys Phe His Ile Leu Leu Ser Leu Val Gly Gly Gln		270
275	280	285
Pro Pro Asp Gln Leu Pro Asp Ser Phe Gln Ala Pro Ala Ala Tyr		
290	295	300

<210> 3
 <211> 1150
 <212> DNA
 <213> Streptomyces hygroscopicus

<220>
 <221> CDS
 <222> (58)..(990)

<400> 3
 gtcgacgaag accggccgga ggccgtcggc cgggccgata ccgtacgcgg cctgcgg 57

 gtg ttc acc ctt ccc gta aca ctg tgg gcg tgt gtc ggc gcg ctg gtg 105
 Val Phe Thr Leu Pro Val Thr Leu Trp Ala Cys Val Gly Ala Leu Val
 1 5 10 15

 ctg gga ctt cag gtg tac gtg ttc gcc gcc tgg ctc gcc gac agc ggc 153
 Leu Gly Leu Gln Val Tyr Val Phe Ala Ala Trp Leu Ala Asp Ser Gly
 20 25 30

 tac cgc atc gag aag gcg tcc ccg gcc agg ggc ggt ggg gac tcg gag 201
 Tyr Arg Ile Glu Lys Ala Ser Pro Ala Arg Gly Gly Gly Asp Ser Glu

35

40

45

cgg atc gcc gat gtg ctg atc ccg ctg ctg tcc gtg gtg gga gcg gtg 249
 Arg Ile Ala Asp Val Leu Ile Pro Leu Leu Ser Val Val Gly Ala Val
 50 55 60

gtc ctc gca gtg tgt ctg tac cgg agg tgt cgg gcc agg agg cgg ctg 297
 Val Leu Ala Val Cys Leu Tyr Arg Arg Cys Arg Ala Arg Arg Arg Leu
 65 70 75 80

acg ttc gac gcg tcg ctc ttc atc ggg ctg ctg tcg gcc agt tgg cag 345
 Thr Phe Asp Ala Ser Leu Phe Ile Gly Leu Leu Ser Ala Ser Trp Gln
 85 90 95

agt ccc ttg atg aac tgg atc aat ccg gtg ctc gcg tca aac gtc aat 393
 Ser Pro Leu Met Asn Trp Ile Asn Pro Val Leu Ala Ser Asn Val Asn
 100 105 110

gtg ttc gga gcg gtg gcc tcg tgg ggg ccg tat gtg ccc ggt tgg cag 441
 Val Phe Gly Ala Val Ala Ser Trp Gly Pro Tyr Val Pro Gly Trp Gln
 115 120 125

ggg gcg ggg gcg cac cag gag gcc gag ctg ccg ctg gcg acc ctg agc 489
 Gly Ala Gly Ala His Gln Glu Ala Glu Leu Pro Leu Ala Thr Leu Ser
 130 135 140

atc tgt atg acg gcc atg atg gcc gcc gtg gcc tgc ggc aag ggc atg 537
 Ile Cys Met Thr Ala Met Met Ala Ala Val Ala Cys Gly Lys Gly Met
 145 150 155 160

ggt ctt gcc gcc gcc cgg tgg ccg cgg ctg ggg ccg ctc cgg ctg atc 585
 Gly Leu Ala Ala Ala Arg Trp Pro Arg Leu Gly Pro Leu Arg Leu Ile
 165 170 175

gcg ctc ggc ttt ctg ctc gtc gtg ctc ctc gac atc gcc gag ccg ctg 633
 Ala Leu Gly Phe Leu Leu Val Val Leu Leu Asp Ile Ala Glu Pro Leu
 180 185 190

gtg tcc ttc gcg ggc gtc tcc gtg tgg acg cgg gca gtg ccc gag ctg 681
 Val Ser Phe Ala Gly Val Ser Val Trp Thr Arg Ala Val Pro Glu Leu
 195 200 205

acc atc tgg agt ggg cac tgg tat cag ttc ccg ctg tat cag atg gtg 729
 Thr Ile Trp Ser Gly His Trp Tyr Gln Phe Pro Leu Tyr Gln Met Val
 210 215 220

gct tcg gcg ctc ttc ggc gcc tot ttg ggg gcc gcg cgc cac ttt cgc 777
 Ala Ser Ala Leu Phe Gly Ala Ser Leu Gly Ala Ala Arg His Phe Arg

225	230	235	240	
aac cgg cgc ggc gaa acg tgt ctg gag tcc ggg gcg gcc ctc cta ccg				825
Asn Arg Arg Gly Glu Thr Cys Leu Glu Ser Gly Ala Ala Leu Leu Pro				
245		250	255	
gag ggc ccg agg cca tgg gtc cgg ctg ctg gcg gtg gtg ggc ggg gcc				873
Glu Gly Pro Arg Pro Trp Val Arg Leu Leu Ala Val Val Gly Gly Ala				
260	265		270	
aac atc agc atc gcc ctc tac acc ggc gca cac ggc gca cac atc ctg				921
Asn Ile Ser Ile Ala Leu Tyr Thr Gly Ala His Gly Ala His Ile Leu				
275	280		285	
ttc tcg ctg atg gac ggc gct ccc ccg gac cgg ctc ccc gaa ttc ttc				969
Phe Ser Leu Met Asp Gly Ala Pro Pro Asp Arg Leu Pro Glu Phe Phe				
290	295		300	
cgt ccg gcg gcc ggc tac tga gaccgccggc accacccacg taccgatgt				1020
Arg Pro Ala Ala Gly Tyr				
305	310			
gcgcgatgtg cctgatgcgc ctgatgtacc cggggtgtca tcggctcacc tgtggcgcct				1080
catgcggtga gcgctccgcc tcgtccttgt tccggctcct gggctccacg accatacggg				1140
gcggccgggg				1150

<210> 4

<211> 310

<212> PRT

<213> Streptomyces hygroscopicus

<400> 4

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

Trp Leu Val Arg Arg Trp Arg Ala Glu Arg Arg Leu Ser Phe Asp Ala
65 70 75 80

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

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

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

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

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

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

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

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

Gly Ala Trp Tyr Arg Ala Arg
210 215

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

<400> 6
tcacgaaacc ggacacac

18

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

<400> 7
catgatcgct gaaccgag

18

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

<400> 8
ggttccggat gccgttctcg

20

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

<400> 9
aactccggtc gactcccctt c

21

<210> 10
<211> 19
<212> DNA
<213> Streptomyces avermitilis

<400> 10
gcaaggatac ggggactac

19

<210> 11
<211> 18
<212> DNA
<213> Streptomyces avermitilis

<400> 11
gaaccgaccg cctgatac

18

<210> 12
<211> 43
<212> DNA
<213> Streptomyces avermitilis

<400> 12
gggggcgggc ccgggtgcgg aggcggaaat gccctggcg acg

43

<210> 13
<211> 20

<212> DNA
<213> Streptomyces avermitilis

<400> 13
ggaaccgacc gcctgataca 20

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

<400> 14
gggggcgggc ccgggtgcgg aggcggaaat gccgctggcg acgacc 46

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

<400> 15
ggaacatcac ggcattcacc 20

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

<400> 16
aaccatccg agccgctc 18

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

<400> 17
tcggcctgcc aacgaac 17

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

<400> 18	
ccaacgaacg tgtagtag	18
<210> 19	
<211> 20	
<212> DNA	
<213> Streptomyces avermitilis	
<400> 19	
tgcaggcgta cgtgttcagc	20
<210> 20	
<211> 17	
<212> DNA	
<213> Streptomyces avermitilis	
<400> 20	
catgatcgct gaaccga	17
<210> 21	
<211> 20	
<212> DNA	
<213> Streptomyces avermitilis	
<400> 21	
catgatcgct gaaccgagga	20
<210> 22	
<211> 20	
<212> DNA	
<213> Streptomyces avermitilis	
<400> 22	
aggagtgtgg tgcgtctgga	20
<210> 23	
<211> 19	
<212> DNA	
<213> Streptomyces avermitilis	
<400> 23	
cttcaggtgt acgtgttcg	19

<210> 24

<211> 18

<212> DNA

<213> *Streptomyces avermitilis*

<400> 24

gaactggtac cagtgcc

18

<210> 25

<211> 46

<212> DNA

<213> *Streptomyces avermitilis*

<400> 25

gggggcgggc ccgggtgcgg aggcggaaat gccgctggcg acgttc

46