



(19) REPUBLIKA HRVATSKA
DRŽAVNI ZAVOD ZA
INTELEKTUALNO VLASNIŠTVO



(21) Broj prijave:

HR P20020130A A2

HR P20020130A A2

(12) PRIJAVA PATENTA

(51) Int. Cl.⁷: **C 12 N 15/60**

C 12 N 9/88

C 12 N 15/76

C 12 N 1/21

C 12 R 1/465

C 12 P 17/18

C 12 P 19/62

(22) Datum podnošenja prijave patenta u HR: 12.02.2002.

(43) Datum objave prijave patenta u HR: 30.06.2003.

(86) Broj međunarodne prijave: PCT/IB00/01017

Datum podnošenja međunarodne prijave 24.07.2000.

(87) Broj međunarodne objave: WO 01/12821

Datum međunarodne objave 22.02.2001.

(31) Broj prve prijave: 60/148,645

(32) Datum podnošenja prve prijave: 12.08.1999.

(33) Država ili organizacija podnošenja prve prijave: US

(71) Podnositelj prijave:

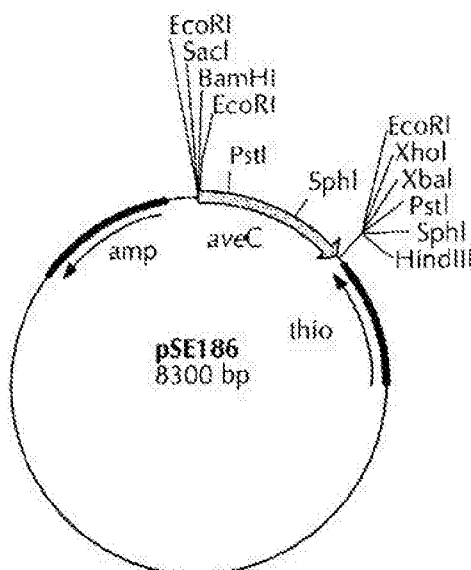
(72) Izumitelji:

Pfizer Products Inc., Eastern Point Road, Groton, 06340 CT, US
Yan Chen, 1765 Bowers Avenue, Santa Clara, 95051 CA, US
Claes Gustafsson, 1813 Bayview Avenue, Belmont, 94002 CA, US
Anke Krebber, 1935 Rock Street, #1, Mountain View, 94043 CA, US
Jeremy Stephen Minshull, 842 Hermosa Way, Menlo Park, 94025 CA, US
Sun Ai Raillard, 964 Trophy Drive, Mountain View, 94043 CA, US
Kim Jonelle Stutzman-Engwall, East Point Road, Groton, 06340 CT, US
Silvije HRASTE, Zagreb, HR

(74) Punomoćnik:

(54) Naziv izuma: **STREPTOMYCES AVERMITILIS GEN KOJI UPRAVLJA ODNOSOM AVERMEKTINA B2:B1**

(57) Sažetak: TZOvaj izum odnosi se na polinukleotidne molekule, koje sadrže nukleotidne sljedove koji kodiraju genski produkt aveC, koje polinukleotidne molekule se može upotrijebiti za promjenu odnosa ili količina avermektina klasa 2:1, dobivenih u fermentacijskim kulturama bakterije *S. avermitilis*. Ovaj izum također se odnosi na vektore, stanice domaćina, te mutantne sojeve bakterije *S. avermitilis* u kojima je aveC gen inaktiviran ili mutiran, kako bi se promijenilo odnos ili količinu dobivenih avermektina klasa 2:1.



HR P20020130A A2

OPIS IZUMA

Područje izuma

- 5 Ovaj izum odnosi se na pripravke i postupke dobivanja avermektina, te prvenstveno ulazi u područje životinjskog zdravlja. Preciznije, ovaj izum odnosi se na polinukleotidne molekule koje sadrže nukleotidne sljedove koji kodiraju genski produkt AveC, koji se može upotrijebiti u moduliranju odnosa avermektina klasa 2:1, koje daju fermentacijske kulture bakterije *Streptomyces avermitilis*, te na pripravke i postupke pregleda takvih polinukleotidnih molekula. Ovaj izum također se odnosi na vektore, transformirane stanice domaćina, te nove mutantne sojeve bakterije *S. avermitilis* u kojima je *aveC* gen mutiran, kako bi se moduliralo odnos dobivenih avermektina klasa 2:1.

Pozadina izuma

1. Avermektini

- 15 *Streptomyces* vrste proizvode veliko mnoštvo sekundarnih metabolita, uključujući avermektine koji su grupa od osam srodnih šesnaesteročlanih makrocikličkih laktona, potentnog anhelmitičkog i insekticidnog djelovanja. Osam različitih, no blisko srodnih spojeva navodi se kao A1a, A1b, A2a, A2b, B1a, B1b, B2a i B2b. "a" grupa spojeva odnosi se na prirodni avermektin, gdje supstituent na položaju C25 je (*S*)-*sec*-butil, a "b" grupa odnosi se na one spojeve gdje supstituent na položaju C25 je izopropil. Oznake "A" i "B" odnose se na avermektine gdje supstituent na položaju C5 je metoksi, odnosno hidroksi. Broj "1" odnosi se na avermektine s dvostrukom vezom na položaju C22,23, a broj "2" odnosi se na avermektine s vodikom na položaju C22, te s hidroksi na položaju C23. Poznato je da, među srodnim avermektinima, B1 tip avermektina ima najdjelotvornije antiparazitičko i pesticidno djelovanje, te je on zato tržišno najpoželjniji avermektin.

- 25 Avermektini i njihovo dobivanje aerobnom fermentacijom od strane sojeva bakterije *S. avermitilis* opisani su u US patentima br. 4.310.519 i 4.429.042. Smatra se da biosinteza nativnih avermektina otpočima endogeno, od CoA tioesterskih analoga izomaslačne kiseline i *S*-(+)-2-metilmaslačne kiseline.

- 30 Kombinacija, kako poboljšanja sojeva slučajnom mutagenезom, tako i upotrebe egzogenih masnih kiselina dovodi do djelotvornog dobivanja avermektinskih analoga. Mutanti bakterije *S. avermitilis* deficijentni u dehidrogenazi razgranatih 2-oksokiselina (bkd deficijentni mutanti) mogu proizvoditi avermektine samo u slučaju kada se u fermentacijske smjese dodaje masne kiseline. Pregled i izolacija mutanata deficijentnih u aktivnosti dehidrogenaze razgranatog lanca (npr. bakterija *S. avermitilis*, ATCC 53567) opisani su u Evropskom patentu (EP) 276103. Fermentacija takvih mutanata u prisustvu egzogenih masnih kiselina rezultira dobivanjem samo četiri avermektina, koji odgovaraju upotrijebljenoj masnoj kiselini. Stoga, dodavanje *S*-(+)-2-metilmaslačne kiseline u fermentacijske smjese s bakterijom *S. avermitilis* (ATCC 53567) rezultira dobivanjem prirodnih avermektina A1a, A2a, B1a i B2a; dodavanje izomaslačne kiseline u fermentacijske smjese rezultira proizvodnjom prirodnih avermektina A1b, A2b, B1b i B2b; dodavanje ciklopentankarboksilne kiseline u fermentacijske smjese rezultira proizvodnjom četiri nova ciklopentilavermektina A1, A2, B1 i B2.

- Ako se dodaje druge masne kiseline, dobiva se nove avermektine. Pregledom preko 800 mogućih prekursora određeno je preko 60 drugih avermektina (vidjeti, npr. Dutton i drugi: "*J. Antibiot.*", 44: 357-365, (1991.); i Banks i drugi: "*Roy. Soc. Chem.*", 147: 16-26, (1994.)), Osim toga, mutanti bakterije *S. avermitilis* deficijentni u 5-*O*-metiltransferaznoj aktivnosti proizvode uglavnom samo B analoge avermektina. Prema tome, mutanti bakterije *S. avermitilis* deficijentni kako u aktivnosti dehidrogenaze razgranatih 2-oksokiselina tako i 5-*O*-metiltransferaze, proizvode samo B avermektine, koji odgovaraju masnoj kiselini upotrijebljenoj za dodavanje u fermentacijsku smjesu. Stoga, dodavanje *S*-(+)-2-metilmaslačne kiseline takvim dvostrukim mutantima rezultira dobivanjem samo prirodnih avermektina B1a i B2a, dok dodavanje izomaslačne kiseline ili ciklopentankarboksilne kiseline rezultira dobivanjem prirodnih avermektina B1b i B2b, odnosno novih B1 i B2 avermektina. Dodavanje cikloheksankarboksilne kiseline dvostruko mutantnom soju poželjan je postupak dobivanja tržišno važnog novog avermektina, cikloheksilavermektina B1 (doramektina). Izolacija i karakteristike takvih dvostrukih mutanata, npr. *S. avermitilis* (ATCC 53692) opisani su u dokumentu EP 276103.

2. Geni uključeni u biosintezu avermektina

U mnogim slučajevima je uočeno da su geni uključeni u dobivanje sekundarnih metabolita i geni koji kodiraju određeni antibiotik grupirani zajedno na kromosomu. Takav je slučaj, npr. sa *Streptomyces* poliketid-sintaznom genskom grupom (*polyketide synthase*, PKS) (vidjeti Hopwood i Sherman: "Ann. Rev. Genet.", 24: 37-66, (1990.)). Stoga je jedna strategija u kloniranju gena u biosinteskom putu bila izolirati gen otpornosti na lijek, te zatim ispitati susjedne regije na kromosomu na druge gene, povezane s biosintezom tog određenog antibiotika. Druga strategija kloniranja gena uključenih u biosintezu važnih metabolita bila je komplementacija mutanata. Primjerice, dijelove biblioteke DNA organizma koji može proizvesti određeni metabolit uvodi se u neproduktivni mutant, a transformante se pregledava na dobivanje metabolita. Osim toga, hibridizaciju biblioteke sondama deriviranim iz drugih *Streptomyces* vrsta upotrebljava se u određivanju i kloniranju gena u biosinteskim putovima.

Geni uključeni u biosintezu avermektina (*ave* geni) grupirani su na kromosomu, slično genima nužnim u biosintezi drugih sekundarnih metabolita kod roda *Streptomyces* (npr. PKS). Nekoliko *ave* gena je uspješno klonirano pomoću vektora za komplementaciju *S. avermitilis* mutanata blokiranih u biosintezi avermektina. Kloniranje takvih gena opisano je u US patentu br. 5.252.474. Osim toga, u Ikeda i drugi: "J. Antibiot.", 48: 532-534, (1995.), opisuje se smještanje kromosomske regije koja uključuje korak dehidratacije C22,23, (*aveC*) u 4,82 kb *Bam*HI fragment iz bakterije *S. avermitilis*, kao i mutacije u *aveC* genu, koje rezultiraju dobivanjem jednokomponentnog proizvođača B2a. Stoga što se ivermektin, potentni anthelmintički spoj, može dobiti kemijskim putem iz avermektina B2a, takvog jednokomponentnog proizvođača avermektina B2a smatra se osobito korisnim u komercijalnoj proizvodnji ivermektina.

Određivanje mutacija u *aveC* genu koje minimaliziraju složenost dobivanja avermektina, poput mutacija koje smanjuju odnos avermektina B2:B1, moglo bi pojednostaviti dobivanje i pročišćavanje tržišno važnih avermektina.

25 Bit izuma

Ovaj izum odnosi se na izoliranu polinukleotidnu molekulu, koja sadrži potpuni *aveC* ORF iz bakterije *S. avermitilis* ili njegov bitan dio, gdje toj izoliranoj molekuli nedostaje slijedeći potpuni ORF, smješten nizvodno od *aveC* ORF *in situ*, na *S. avermitilis* kromosomu. Izolirana polinukleotidna molekula prema ovom izumu po mogućnosti sadrži nukleotidni slijed, isti kao *S. avermitilis* slijed, s plazmida pSE186 (ATCC 209604), koji kodira genski produkt AveC ili isti kao nukleotidni slijed *aveC* ORF sa Slike 1 (SEQ ID NO: 1), ili njegov bitan dio. Ovaj izum također se odnosi na izoliranu polinukleotidnu molekulu, koja sadrži nukleotidni slijed SEQ ID NO: 1 ili njegovu degeneriranu varijantu.

Ovaj izum također se odnosi na izoliranu polinukleotidnu molekulu, koja sadrži nukleotidni slijed homologan *S. avermitilis* slijedu, s plazmida pSE186 (ATCC 209604), koji kodira genski produkt AveC, ili nukleotidnom slijedu *aveC* ORF prikazanom na Slici 1 (SEQ ID NO: 1) ili njegovom bitnom dijelu.

Ovaj izum također se odnosi na izoliranu polinukleotidnu molekulu, koja sadrži nukleotidni slijed koji kodira polipeptid aminokiselinskog slijeda homolognog aminokiselinskog slijedu, kojeg kodira slijed, s plazmida pSE186 (ATCC 209604), koji kodira genski produkt AveC, ili aminokiselinskog slijedu sa Slike 1 (SEQ ID NO: 2) ili njegovom bitnom dijelu.

Ovaj izum također se odnosi na izoliranu polinukleotidnu molekulu, koja sadrži nukleotidni slijed koji kodira genski produkt homolog AveC. U poželjnoj izvedbi, izolirana polinukleotidna molekula sadrži nukleotidni slijed koji kodira homolog genskog produkta AveC iz bakterije *S. hygroscopicus*, gdje homolog genskog produkta sadrži aminokiselinski slijed SEQ ID NO: 4 ili njegov bitan dio. U poželjnoj izvedbi, izolirana polinukleotidna molekula prema ovom izumu, koja kodira *S. hygroscopicus* homolog genskog produkta AveC, sadrži nukleotidni slijed SEQ ID NO: 3 ili njegov bitan dio.

Ovaj izum također se odnosi na izoliranu polinukleotidnu molekulu, koja sadrži nukleotidni slijed homologan *S. hygroscopicus* nukleotidnom slijedu SEQ ID NO: 3. Ovaj izum također se odnosi na izoliranu polinukleotidnu molekulu, koja sadrži nukleotidni slijed, koji kodira polipeptid homologan *S. hygroscopicus* homologu genskog produkta AveC, aminokiselinskog slijeda SEQ ID NO: 4.

Ovaj izum također se odnosi na oligonukleotide koji se hibridiziraju s polinukleotidnom molekulom nukleotidnog slijeda sa Slike 1 (SEQ ID No:1) ili SEQ ID NO: 3, ili s polinukleotidnom molekulom nukleotidnog slijeda komplementarnog nukleotidnom slijedu sa Slike 1 (SEQ ID NO: 1) ili SEQ ID NO: 3.

Ovaj izum također se odnosi na rekombinantne klonske vektore i ekspresijske vektore, korisne u kloniranju ili ekspresiji polinukleotida prema ovom izumu, uključujući polinukleotidne molekule koje sadrže *aveC* ORF iz bakterije *S. avermitilis* ili ORF homologan *aveC*. U neograničavajućoj izvedbi, ovaj izum odnosi se na plazmid pSE186 (ATCC

209604), koji sadrži cjelokupni ORF *aveC* gena iz bakterije *S. avermitilis*. Ovaj izum također se odnosi na transformirane stanice domaćina, koje sadrže polinukleotidnu molekulu ili rekombinantni vektor prema ovom izumu, te na nove sojeve ili iz njih derivirane stanične linije.

5 Ovaj izum također se odnosi na rekombinantno eksprimiran genski produkt AveC ili genski produkt homolog AveC, ili njegovog bitan dio, uglavnom pročišćen ili izoliran, kao i njihove homologe. Ovaj izum također se odnosi na postupak dobivanja rekombinantnog genskog produkta AveC, koji se sastoji od kultiviranja stanice domaćina transformirane rekombinantnim ekspresijskim vektorom, gdje navedeni rekombinantni ekspresijski vektor sadrži polinukleotidnu molekulu nukleotidnog slijeda koji kodira genski produkt AveC ili genski produkt homolog AveC, gdje polinukleotidna
10 molekula je u operativnoj asocijaciji s jednim ili više regulacijskih elemenata, koji kontroliraju ekspresiju polinukleotidne molekule u stanici domaćina, pod povoljnim uvjetima u dobivanju rekombinantnog genskog produkta AveC ili homologa genskog produkta AveC, te na prikupljanje genskog produkta AveC ili homologa genskog produkta AveC iz kulture stanica.

15 Ovaj izum također se odnosi na polinukleotidnu molekulu koja sadrži nukleotidni slijed, inače isti kao *S. avermitilis* AveC alel, ili slijed, iz plazmida pSE186 (ATCC 209604), koji kodira genski produkt AveC ili njegova degenerirana varijanta, ili nukleotidni slijed *aveC* ORF iz bakterije *S. avermitilis*, kao što je prikazano na Slici 1 (SEQ ID NO: 1) ili njegova degenerirana varijanta, no koja također ima jednu ili više mutacija, tako da stanice *S. avermitilis* soja ATCC 53692 gdje je divlji tip *aveC* alela inaktiviran, te koji eksprimira polinukleotidnu molekulu, koja sadrži mutirani
20 nukleotidni slijed, proizvode avermektine u različitom odnosu ili količini od onih koje proizvode stanice *S. avermitilis* soja ATCC 53692, koje umjesto toga ekspimiraju samo divlji tip *aveC* alela. Prema ovom izumu, takve polinukleotidne molekule može se upotrijebiti u dobivanju novih sojeva bakterije *S. avermitilis*, koji pokazuju uočljivu promjenu u dobivanju avermektina, u usporedbi s istim sojem, koji umjesto toga eksprimira samo divlji tip *aveC* alela. U poželjnoj izvedbi, takve polinukleotidne molekule korisne su u dobivanju novih sojeva bakterije *S. avermitilis*, koji proizvode
25 avermektine u smanjenom odnosu klasa 2:1, u usporedbi s onim kod istog soja, koji umjesto toga eksprimira samo divlji tip *aveC* alela. U slijedećoj poželjnoj izvedbi, takve polinukleotidne molekule korisne su u dobivanju novih sojeva bakterije *S. avermitilis*, koji proizvode povećane količine avermektina, u usporedbi s istim sojem, koji umjesto toga eksprimira samo pojedinačni divlji tip *aveC* alela. U slijedećoj poželjnoj izvedbi, takve polinukleotidne molekule korisne su u dobivanju novih sojeva bakterije *S. avermitilis*, u kojima je *aveC* gen inaktiviran.

30 Ovaj izum također se odnosi na postupke određivanja mutacija *aveC* ORF iz bakterije *S. avermitilis*, koje mogu promijeniti odnos i/ili količinu dobivenih avermektina. U poželjnoj izvedbi, ovaj izum odnosi se na postupak određivanja mutacija *aveC* ORF, koje mogu promijeniti odnos dobivenih avermektina klasa 2:1, koji se sastoji u: (a) određivanju odnosa avermektina klasa 2:1, koje proizvode stanice soja bakterije *S. avermitilis*, u kojima je nativni *aveC* alel inaktiviran, te u koje je uvedena i ekspimirana polinukleotidna molekula, koja sadrži nukleotidni slijed koji kodira mutirani genski produkt AveC; (b) određivanju odnosa avermektina klasa 2:1, koje proizvode stanice soja bakterije *S. avermitilis* kao u koraku (a), no koje umjesto toga ekspimiraju samo divlji tip *aveC* alela ili ORF sa Slike 1 (SEQ ID NO: 1) ili njemu homologan nukleotidni slijed; te (c) uspoređivanju odnosa avermektina klasa 2:1, koje proizvode stanice bakterije *S. avermitilis* iz koraka (a) s odnosom avermektina klasa 2:1, koje proizvode stanice bakterije *S. avermitilis* u koraku (b); tako da ako se odnos avermektina klasa 2:1, koje proizvode stanice bakterije *S. avermitilis* u koraku (a), razlikuje od odnosa avermektina klasa 2:1, koje proizvode stanice bakterije *S. avermitilis* u koraku (b), mutacija *aveC* ORF, koja može promijeniti odnos avermektina klasa 2:1, je određena. U poželjnoj izvedbi, odnos avermektina klasa 2:1 je smanjen mutacijom.

45 U slijedećoj poželjnoj izvedbi, ovaj izum odnosi se na postupak određivanja mutacija *aveC* ORF ili genskih konstrukata koji sadrže *aveC* ORF koji može promijeniti količinu proizvedenih avermektina, koji se sastoji u: (a) određivanju količine avermektina koje proizvode stanice soja bakterije *S. avermitilis* u kojima je nativni *aveC* alel inaktiviran, te u koje je uvedena i ekspimirana polinukleotidna molekula, koja sadrži nukleotidni slijed koji kodira mutirani genski produkt AveC ili genski konstrukt, koji sadrži nukleotidni slijed koji kodira genski produkt AveC; (b)
50 određivanju količine avermektina koje proizvode stanice istog soja bakterije *S. avermitilis* kao u koraku (a), no koje umjesto toga ekspimiraju samo jedan *aveC* alel, koji ima nukleotidni slijed kao ORF sa Slike 1 (SEQ ID NO: 1) ili njemu homologni nukleotidni slijed; te (c) uspoređivanju količine avermektina koje proizvode stanice bakterije *S. avermitilis* iz koraka (a) s količinom avermektina koje proizvode stanice bakterije *S. avermitilis* iz koraka (b); tako da, ako se količina avermektina koje proizvode stanice bakterije *S. avermitilis* iz koraka (a) razlikuje od količine avermektina koje proizvode stanice bakterije *S. avermitilis* iz koraka (b), mutacija *aveC* ORF ili genski konstrukt, koji može promijeniti količinu avermektina, su određeni. U poželjnoj izvedbi, mutacija povećava količinu dobivenih avermektina.

60 Ovaj izum također se odnosi na rekombinantne vektore, korisne u dobivanju novih sojeva bakterije *S. avermitilis* s izmijenjenom proizvodnjom avermektina. Primjerice, ovaj izum odnosi se na vektore koje se može upotrijebiti u ciljanju bilo kojih polinukleotidnih molekula, koje sadrže mutirane nukleotidne slijedove prema ovom izumu, na mjesto

aveC gena na *S. avermitilis* kromosomu, bilo radi insercije unutar njega ili radi zamjene *aveC* alela ili ORF ili njegovog dijela homolognom rekombinacijom. Prema ovom izumu, međutim, ovdje polinukleotidna molekula prema ovom izumu, koja sadrži mutirani nukleotidni slijed prema ovom izumu, može također modulirati biosintezu avermektina kada je se insertira u *S. avermitilis* kromosom na mjestu različitom od *aveC* gena, ili kada se održava u obliku episoma u stanicama bakterije *S. avermitilis*. Stoga se ovaj izum također odnosi na vektore koji sadrže polinukleotidnu molekulu, koja sadrži mutirani nukleotidni slijed prema ovom izumu, gdje se ta vektore može upotrijebiti za insertiranje polinukleotidne molekule u mjesto na *S. avermitilis* kromosomu koje nije *aveC* gen, ili ih se može održavati u obliku episoma. U poželjnoj izvedbi, ovaj izum odnosi se na vektore genske zamjene, koje se može upotrijebiti za insertiranje mutiranog *aveC* alela u *S. avermitilis* kromosom, kako bi se dobilo nove sojeve stanica koje daju smanjeni odnos avermektina klasa 2:1, u usporedbi sa stanicama istog soja, koje umjesto toga ekspimiraju samo divlji tip *aveC* alela.

Ovaj izum također se odnosi na postupke dobivanja novih sojeva bakterije *S. avermitilis*, koje čine stanice koje ekspimiraju mutirani *aveC* alel i koje daju izmijenjene odnose i/ili količine avermektina, u usporedbi sa stanicama istog soja bakterije *S. avermitilis*, koje umjesto toga ekspimiraju samo divlji tip *aveC* alela. U poželjnoj izvedbi, ovaj izum odnosi se na postupak dobivanja novih sojeva bakterije *S. avermitilis*, koje čine stanice koje ekspimiraju mutirani *aveC* alel, te koje daju izmijenjeni odnos avermektina klasa 2:1, u usporedbi sa stanicama istog soja bakterije *S. avermitilis*, koje umjesto toga ekspimiraju samo divlji tip *aveC* alela, koji se sastoji u transformiranju stanica soja bakterije *S. avermitilis* vektorom koji nosi mutirani *aveC* alel, koji kodira genski produkt koji mijenja odnos avermektina klasa 2:1, kakav daju stanice soja bakterije *S. avermitilis* koje ekspimiraju mutirani alel, u usporedbi sa stanicama istog soja, koje umjesto toga ekspimiraju samo divlji tip *aveC* alela, te selekciji transformiranih stanica koje daju izmijenjeni odnos avermektine klasa 2:1, u usporedbi s odnosom klasa 2:1, kakav daju stanice tog soja, koje umjesto toga ekspimiraju divlji tip *aveC* alela. U poželjnoj izvedbi, odnos klasa 2:1 dobivenih avermektina smanjen je u stanicama novog soja.

U slijedećoj poželjnoj izvedbi, ovaj izum odnosi se na postupak dobivanja novih sojeva bakterije *S. avermitilis*, koje čine stanice koje daju izmijenjene količine avermektina, koji se sastoji u transformiranju stanica soja bakterije *S. avermitilis* vektorom koji nosi mutirani *aveC* alel ili genski konstrukt koji sadrži *aveC* alel, čija ekspresija rezultira izmijenjenom količinom avermektina, kakvu daju stanice soja bakterije *S. avermitilis* koje ekspimiraju mutirani *aveC* alel ili genski konstrukt, u usporedbi sa stanicama tog soja, koje umjesto toga ekspimiraju samo divlji tip *aveC* alela, te selekciji transformiranih stanica daju izmijenjenu količinu avermektina, u usporedbi s količinom avermektina, kakvu daju bakterije tog soja, koje umjesto toga ekspimiraju samo divlji tip *aveC* alela. U poželjnoj izvedbi, količina dobivenih avermektina povećana je u stanicama novog soja.

U slijedećoj poželjnoj izvedbi, ovaj izum odnosi se na postupak dobivanja novih sojeva bakterije *S. avermitilis*, čije stanice sadrže inaktivirani *aveC* alel, koji se sastoji u transformiranju stanica soja bakterije *S. avermitilis* koji ekspimiraju bilo koji *aveC* alel vektorom koji inaktivira *aveC* alel, te selekciji transformiranih stanica u kojima je *aveC* alel inaktiviran.

Ovaj izum također se odnosi na nove sojeve bakterije *S. avermitilis*, koje čine stanice transformirane bilo kojim polinukleotidnim molekulama ili vektorima koji sadrže mutirani nukleotidni slijed prema ovom izumu. U poželjnoj izvedbi, ovaj izum odnosi se na nove sojeve bakterije *S. avermitilis*, koje čine stanice koje ekspimiraju mutirani *aveC* alel, umjesto, ili uz divlji tip *aveC* alela, gdje stanice novog soja daju izmijenjeni odnos avermektina klasa 2:1, u usporedbi sa stanicama istog soja, koji umjesto toga ekspimiraju samo divlji tip *aveC* alela. U poželjnijoj izvedbi, stanice novog soja daju smanjeni odnos avermektina klasa 2:1, u usporedbi sa stanicama istog soja, koje umjesto toga ekspimiraju samo divlji tip *aveC* alela. Takvi novi sojevi korisni su u proizvodnji industrijskih dimenzija tržišno poželjnih avermektina, poput doramektina.

U slijedećoj poželjnoj izvedbi, ovaj izum se odnosi na nove sojeve bakterije *S. avermitilis*, koje čine stanice koje ekspimiraju mutirani *aveC* alel, ili genski konstrukt koji sadrži *aveC* alel, umjesto, ili uz nativni *aveC* alel, što rezultira time da stanice daju izmijenjenu količinu avermektina, u usporedbi s količinom avermektina kakvu daju stanice istog soja, koje umjesto toga ekspimiraju samo divlji tip *aveC* alela. U poželjnoj izvedbi, nove stanice daju povećanu količinu avermektina.

U slijedećoj poželjnoj izvedbi, ovaj izum se odnosi na nove sojeve bakterije *S. avermitilis*, koje čine stanice u kojima je *aveC* gen inaktiviran. Takvi sojevi korisni su kako u dobivanju različitog spektra avermektina, u usporedbi sa sojem divljeg tipa, tako i u preglednim komplementacijskim testovima, kao što je opisano u ovoj specifikaciji, kako bi se odredilo utječe li usmjerena ili slučajna mutagenaza *aveC* gena na dobivanje avermektina.

Ovaj izum također se odnosi na postupak dobivanja avermektina, koji se sastoji u kultiviranju stanica soja bakterije *S. avermitilis*, koje ekspimiraju mutirani *aveC* alel, koji kodira genski produkt koji mijenja odnos avermektina klasa 2:1, kakav daju stanice soja bakterije *S. avermitilis* koje ekspimiraju mutirani *aveC* alel, u usporedbi sa stanicama istog soja, koje ne ekspimiraju mutirani *aveC* alel, no umjesto toga ekspimiraju samo divlji tip *aveC* alela, u medijima za

kulturu, pod uvjetima koji tu omogućuju ili induciraju dobivanje avermektina, te prikupljanju navedenih avermektina iz kulture. U poželjnoj izvedbi, odnos avermektina klasa 2:1, kakav daju stanice koje eksprimiraju mutaciju, je smanjen. Ovaj postupak omogućuje povećanu djelotvornost u dobivanju tržišno vrijednih avermektina, poput doramektina.

- 5 Ovaj izum također se odnosi na postupak dobivanja avermektina, koji se sastoji u kultiviranju stanica soja bakterije *S. avermitilis* koje eksprimiraju mutirani *aveC* alel ili genski konstrukt koji sadrži *aveC* alel, što rezultira dobivanjem izmijenjene količine avermektina, kakvu daju stanice soja bakterije *S. avermitilis*, koje eksprimiraju mutirani *aveC* alel ili genski konstrukt, u usporedbi sa stanicama istog soja, koje ne eksprimiraju mutirani *aveC* alel ili genski konstrukt, no umjesto toga eksprimiraju samo divlji tip *aveC* alela, u medijima za kulturu, pod uvjetima koji tu omogućuju ili
- 10 induciraju dobivanje avermektina, te prikupljanju navedenih avermektina iz kulture. U poželjnoj izvedbi, količina avermektina, kakvu daju stanice koje eksprimiraju mutaciju ili genski konstrukt, je povećana.

- Ovaj izum također se odnosi na novi pripravak avermektina, koje proizvodi soj bakterije *S. avermitilis* koji eksprimira mutirani *aveC* alel prema ovom izumu, gdje se avermektine dobiva u smanjenom odnosu klasa 2:1, u usporedbi s
- 15 odnosom avermektina klasa 2:1, kakav daju stanice istog soja bakterije *S. avermitilis*, koje ne eksprimiraju mutirani *aveC* alel, no umjesto toga eksprimiraju samo divlji tip *aveC* alela. Novi pripravak avermektina može biti u obliku u kakvom je dobiven fermentacijom fluida za kulturu, ili ga se može otuda prikupiti, te ga se može otuda djelomično ili dobro pročistiti.

20 **Kratki opis slika**

- Slika 1. Slijed DNA (SEQ ID NO: 1) koji sadrži *S. avermitilis* *aveC* ORF, te izveden aminokiselinski slijed (SEQ ID NO: 2).
- Slika 2. Plazmidni vektor pSE186 (ATCC 209604) koji sadrži potpuni ORF *aveC* gena bakterije *S. avermitilis*.
- Slika 3. Vektor genske zamjene pSE180 (ATCC 209605) koji sadrži *ermE* gen iz bakterije *Sacc. erythraea*, insertiran u *aveC* ORF bakterije *S. avermitilis*.
- Slika 4. *Bam*HI restrikcijska mapa avermektinske poliketid-sintazne genske grupe iz bakterije *S. avermitilis* s pet određenih preklapajućih kozmidnih klonova (npr. pSE65, pSE66, pSE67, pSE68, pSE69). Prikazan je i odnos između pSE118 i pSE119.
- Slika 5. HPLC analiza produkata fermentacije, koje daju sojevi bakterije *S. avermitilis*. Vršna kvantifikacija provedena je usporedbom standardnih količina cikloheksil-B1. Vrijeme zadržavanja cikloheksil-B2 bilo je 7,4-7,7 minuta; vrijeme zadržavanja cikloheksil-B1 bilo je 11,9-12,3 minuta.
- Slika 5A. *S. avermitilis* soj SE180-11 s inaktiviranim *aveC* ORF.
- Slika 5B. *S. avermitilis* soj SE180-11 transformiran s pSE186 (ATCC 209604).
- Slika 5C. *S. avermitilis* soj SE180-11 transformiran s pSE187.
- Slika 5D. *S. avermitilis* soj SE180-11 transformiran s pSE188.
- Slika 6. Usporedba izvedenih aminokiselinskih sljedova koje kodira *aveC* ORF iz bakterije *S. avermitilis* (SEQ ID NO: 2), djelomični homolog *aveC* ORF iz bakterije *S. griseochromogenes* (SEQ ID NO: 5), te homolog *aveC* ORF iz bakterije *S. hygroscopicus* (SEQ ID NO: 4). Valinski ostatak u masno tiskanom tekstu je moguće startno mjesto za protein. Konzervirani ostaci prikazani su velikim slovima za homologiju u sva tri slijeda, a malim slovima za homologiju u 2 od 3 slijeda. Aminokiselinski sljedovi sadrže približno 50 % istovjetnosti sljedova.
- Slika 7. Hibridni plazmidni konstrukt koji sadrži 564 bp *Bsa*AI/*Kpn*I fragment iz bakterije *S. hygroscopicus*, homologan *aveC* genu, insertiran na *Bsa*A/*Kpn*I mjesto u *S. avermitilis* *aveC* ORF.

Detaljni opis izuma

- 25 Ovaj izum odnosi se na određivanje i karakterizaciju polinukleotidnih molekula, koje sadrže nukleotidne sljedove koji kodiraju genski produkt AveC iz bakterije *Streptomyces avermitilis*, konstrukciju novih sojeva bakterije *S. avermitilis*, koje se može upotrijebiti u pregledu mutiranih genskih produkata AveC, u pogledu njihovog utjecaja na dobivanje avermektina, te otkriće da neki mutirani genski produkti AveC mogu smanjiti odnos avermektina B2:B1, kakav daje

bakterija *S. avermitilis*. Izum je pomoću primjera opisan u poglavljima niže, u pogledu polinukleotidne molekule bilo nukleotidnog slijeda istog kao *S. avermitilis* slijed, s plazmida pSE186 (ATCC 209604), koji kodira genski produkt AveC, ili kao nukleotidni slijed ORF sa Slike 1 (SEQ ID NO: 1), te u pogledu polinukleotidnih molekula, koje sadrže otud derivirane mutirane nukleotidne sljedove i njihove degenerirane varijante. Međutim se principe, navedene gore u ovom izumu, može analogno primijeniti na druge polinukleotidne molekule, uključujući homolog *aveC* gena iz drugih *Streptomyces* vrsta, uključujući, npr. *S. hygroscopicus* i *S. griseochromogenes*, između ostalih.

1. Polinukleotidne molekule koje kodiraju *S. avermitilis* genski produkt AveC

Ovaj izum odnosi se na izoliranu polinukleotidnu molekulu, koja sadrži potpuni *aveC* ORF iz bakterije *S. avermitilis* ili njegov bitan dio, gdje izoliranoj polinukleotidnoj molekuli nedostaje slijedeći potpuni ORF, smješten nizvodno od *aveC* ORF *in situ* na *S. avermitilis* kromosomu.

Izolirana polinukleotidna molekula prema ovom izumu po mogućnosti sadrži nukleotidni slijed isti kao *S. avermitilis* slijed, s plazmida pSE186 (ATCC 209604), koji kodira genski produkt AveC, ili je isti kao nukleotidni slijed kao ORF sa Slike 1 (SEQ ID NO: 1) ili njegov bitan dio. Kao što se ovdje upotrebljava, "bitan dio" izolirane polinukleotidne molekule, koja sadrži nukleotidni slijed koji kodira *S. avermitilis* genski produkt AveC, je izolirana polinukleotidna molekula, koja sadrži najmanje oko 70 % potpunog *aveC* ORF slijeda, prikazanog na Slici 1 (SEQ ID NO: 1), te koja kodira funkcionalni ekvivalent genskog produkta AveC. U ovom pogledu, "funkcionalni ekvivalent" genskog produkta AveC definira se kao genski produkt koji, kada ga eksprimira *S. avermitilis* soj ATCC 53692, u kojem je nativni *aveC* alel inaktiviran, rezultira dobivanjem uglavnom istog odnosa i količine avermektina, kao prilikom dobivanja od strane *S. avermitilis* soja ATCC 53692, koji umjesto toga eksprimira samo divlji tip, funkcionalni *aveC* alel, nativan u *S. avermitilis* soju ATCC 53692.

Uz nukleotidni slijed *aveC* ORF, izolirane polinukleotidne molekule prema ovom izumu mogu također sadržavati nukleotidne sljedove koji su prirodno susjedni *aveC* genu *in situ* u *S. avermitilis*, poput pobočnih nukleotidnih sljedova prikazanih na Slici 1 (SEQ ID NO: 1).

Ovaj izum također se odnosi na izoliranu polinukleotidnu molekulu, koja sadrži nukleotidni slijed SEQ ID NO: 1 ili njegovu degeneriranu varijantu.

Kao što se ovdje upotrebljava, izrazi "polinukleotidna molekula", "polinukleotidni slijed", "kodirajući slijed", "otvoreni okvir čitanja", te "ORF" označuju kako DNA tako i RNA molekule, koje mogu biti bilo jednolančane ili dvolančane, te koje se, kada ih se stavi pod kontrolu prikladnih regulacijskih elemenata u prikladnom ekspresijskom sustavu stanice domaćina, može transkribirati i translirati (DNA), ili translirati (RNA), u genski produkt AveC ili, kao što je opisano niže, u homolog genskog produkta AveC, ili u polipeptid homologan genskom produktu AveC ili homologu genskog produkta AveC. Kodirajući slijed može uključivati, ali nije time ograničen, prokariotske sljedove, sljedove cDNA, sljedove genomske DNA, te kemijski sintetizirane sljedove DNA i RNA.

Nukleotidni slijed prikazan na Slici 1 (SEQ ID NO: 1) sadrži četiri različita GTG kodona na bp položajima (položaji baznih parova) 42, 174, 177 i 180. Kao što je opisano u Poglavlju 9 niže, konstruirane su višestruke delecije u 5'-regiji *aveC* ORF (Slika 1; SEQ ID NO: 1), kako bi se pomoglo određivanje koji od bi ovih kodona mogli funkcionirati u *aveC* ORF kao startna mjesta za ekspresiju proteina. Delecija prvog GTG mjesta na bp 42 nije uklonila aktivnost AveC. Dodatna delecija svih GTG kodona, na bp položajima 174, 177 i 180 zajedno, uklanja aktivnost AveC, što znači da je ova regija potrebna za ekspresiju proteina. Ovaj izum stoga obuhvaća *aveC* ORF različitih duljina.

Ovaj izum također se odnosi na polinukleotidnu molekulu nukleotidnog slijeda, homolognog *S. avermitilis* slijedu, s plazmida pSE186 (ATCC 209604), koji kodira genski produkt AveC, ili nukleotidnom slijedu *aveC* ORF prikazanom na Slici 1 (SEQ ID NO: 1) ili njegovom bitnom dijelu. Izraz "homologan", kada ga se upotrebljava u značenju polinukleotidne molekule homologne *S. avermitilis* slijedu koji kodira genski produkt AveC, odnosi se na polinukleotidnu molekulu nukleotidnog slijeda: (a) koji kodira isti genski produkt AveC kao *S. avermitilis* slijed, s plazmida pSE186 (ATCC 209604), koji kodira genski produkt AveC, ili koji kodira isti genski produkt AveC, kao nukleotidni slijed *aveC* ORF prikazan na Slici 1 (SEQ ID NO: 1), no koji uključuje jednu ili više tih izmjena u nukleotidnom slijedu, u skladu s degeneriranošću genskog koda (tj. degenerirana varijanta), ili (b) koji hibridizira s komplementom polinukleotidne molekule, nukleotidnog slijeda koji kodira aminokiselinski slijed, kojeg kodira slijed s plazmida pSE186 (ATCC 209604), koji kodira genski produkt AveC, ili koji kodira aminokiselinski slijed prikazan na Slici 1 (SEQ ID NO: 2) pod umjereno strogim uvjetima, tj. hibridizacija s filterski vezanom DNA u 0,5 M NaHPO₄, 7 % natrij-dodecil-sulfatu (SDS), 1 mM EDTA na 65 °C, uz ispiranje u 0,2 × SSC/0,1 % SDS na 42 °C (vidjeti Ausubel i drugi: "Current Protocols in Molecular Biology", Svezak I, izdavači Green Publishing Associates Inc. i John Wiley & Sons Inc., New York, na str. 2.10.3, (1989.)), i kodira genski produkt funkcionalno ekvivalentan AveC, kao što je definirano gore. U poželjnoj izvedbi, homologna polinukleotidna molekula hibridizira s komplementom nukleotidnog

slijeda, s plazmida pSE186 (ATCC 209604), koji kodira genski produkt AveC ili komplementom nukleotidnog slijeda *aveC* ORF prikazanog na Slici 1 (SEQ ID NO: 1) ili njegovim bitnim dijelom, pod veoma strogim uvjetima, tj. hibridizacija s filterski vezanom DNA u 0,5 M NaHPO₄, 7 % SDS, 1 mM EDTA na 65 %, uz ispiranje u 0,1 × SSC/0,1 % SDS na 68 °C (Ausubel i drugi: 1989, gore), te kodira funkcionalni ekvivalent genskog produkta AveC, kao što je definirano gore.

Aktivnost genskog produkta AveC i njegovih potencijalnih funkcionalnih ekvivalenata može se odrediti HPLC analizom produkata fermentacije, kao što je opisano niže u Primjerima. Polinukleotidne molekule nukleotidnih sljedova koji kodiraju funkcionalne ekvivalente *S. avermitilis* genskog produkta AveC, uključujući *aveC* gene prirodno prisutne u drugim sojevima bakterije *S. avermitilis*, homologe *aveC* gena prisutnih u drugim vrstama roda *Streptomyces*, te mutirane *aveC* alela, bilo prirodne ili konstruirane.

Ovaj izum također se odnosi na polinukleotidnu molekulu, koja sadrži nukleotidni slijed koji kodira polipeptid aminokiselinskog slijeda homolognog aminokiselinskog slijeda, kojeg kodira slijed koji kodira genski produkt AveC s plazmida pSE186 (ATCC 209604), ili aminokiselinskog slijeda sa Slike 1 (SEQ ID NO: 2) ili njegovom bitnom dijelom. Kao što se ovdje upotrebljava, "bitan dio" aminokiselinskog slijeda sa Slike 1 (SEQ ID NO: 2) je polipeptid koji sadrži najmanje oko 70 % aminokiselinskog slijeda prikazanog na Slici 1 (SEQ ID NO: 2), te koji je funkcionalni ekvivalent genskog produkta AveC, kao što je definirano gore.

Kao što se ovdje upotrebljava, u pogledu aminokiselinskih sljedova homolognih aminokiselinskog slijeda genskog produkta AveC iz bakterije *S. avermitilis*, izraz "homologan" odnosi se na polipeptid koji inače ima aminokiselinski slijed sa Slike 1 (SEQ ID NO: 2), ali kod kojeg je jedan ili više aminokiselinskih ostataka konzervativno supstituiran različitim aminokiselinskim ostatkom, gdje navedeni aminokiselinski slijed je najmanje oko 70 %, poželjnije najmanje oko 80 %, te najpoželjnije oko 90 %, istovjetan aminokiselinskog slijeda kojeg kodira slijed koji kodira genski produkt AveC s plazmida pSE186 (ATCC 209604), ili aminokiselinskog slijeda sa Slike 1 (SEQ ID NO: 2), kao što je određeno bilo kojim standardnim algoritmom za istovjetnost aminokiselinskog slijeda, poput algoritma BLASTP (GENBANK, NCBI), te gdje takva konzervativna supstitucija rezultira funkcionalno ekvivalentnim genskim produktom, kao što je definirano gore. Konzervativne aminokiselinske supstitucije dobro su poznate u ovom području tehnike. Pravila provođenja takvih supstitucija uključuju ona opisana, između ostalog, u M.D. Dayhof: "Nat. Biomed. Res. Found.", Washington D.C., Svezak 5, Dodatak 3, (1978.). Specifičnije, konzervativne aminokiselinske supstitucije su one koje se događaju unutar porodice aminokiselina koje se odnose na kiselost i polarnost. Genetski kodirane aminokiseline općenito se dijele u četiri grupe: (1) kisela = aspartat, glutamat; (2) bazična = lizin, arginin, histidin; (3) nepolarna = alanin, valin, leucin, izoleucin, prolin, fenilalanin, metionin, triptofan; te (4) nenabijena polarna = glicin, asparagin, glutamin, cistein, serin, treonin, tirozin. Fenilalanin, triptofan i tirozin se također zajednički klasificira kao aromatske aminokiseline. Jedna ili više zamjena unutar bilo koje pojedine grupe, npr. leucina izoleucinom ili valinom, ili aspartata glutamatom, ili treonina serinom, ili bilo kojeg drugog aminokiselinskog ostatka strukturno sličnim aminokiselinskim ostatkom, npr. aminokiselinskim ostatkom slične kiselosti i polarnosti, ili sličnim u nekoj odgovarajućoj kombinaciji, općenito će nebitno utjecati na funkciju polipeptida.

Ovaj izum također se odnosi na izoliranu polinukleotidnu molekulu, koja sadrži nukleotidni slijed koji kodira homolog genskog produkta AveC. Kao što se ovdje upotrebljava, "homolog genskog produkta AveC" definira se kao genski produkt s najmanje oko 50 % istovjetnosti aminokiselinskog slijeda, u odnosu na *S. avermitilis* genski produkt AveC, koji sadrži aminokiselinski slijed, kojeg kodira slijed, s plazmida pSE186 (ATCC 209604), koji kodira genski produkt AveC, ili na aminokiselinski slijed prikazan na Slici 1 (SEQ ID NO: 2), kao što je određeno bilo kojim standardnim algoritmom istovjetnosti aminokiselinskog slijeda, poput algoritma BLASTP (GENBANK, NCBI). U neograničavajućoj izvedbi homolog genskog produkta AveC dolazi iz bakterije *S. hygroscopicus*, (opisano u EP patentnoj prijavi 0298423; depozitu FERM BP-1901) i sadrži aminokiselinski slijed SEQ ID NO: 4, ili njegov bitan dio. "Bitan dio" aminokiselinskog slijeda SEQ ID NO: 4 je polipeptid, koji sadrži najmanje oko 70 % aminokiselinskog slijeda SEQ ID NO: 4, te koji je funkcionalni ekvivalent genskog produkta homologa AveC. "Funkcionalni ekvivalent" homologa genskog produkta AveC definira se kao genski produkt koji, kada ga se eksprimira u *S. hygroscopicus* soju FERM BP-1901, u kojem je nativni alel homologan *aveC* inaktiviran, rezultira dobivanjem uglavnom istog odnosa i količine milbemicina, kao prilikom dobivanja od strane *S. hygroscopicus* soja FERM BP-1901, koji umjesto toga eksprimira samo divlji tip, funkcionalni homolog *aveC* alela, nativni za *S. hygroscopicus* soj FERM BP-1901. U neograničavajućoj izvedbi, izolirana polinukleotidna molekula prema ovom izumu, koja kodira *S. hygroscopicus* genski produkt homolog AveC, sadrži nukleotidni slijed SEQ ID NO: 3 ili njegov bitan dio. U ovom pogledu, "bitan dio" izolirane polinukleotidne molekule, koja sadrži nukleotidni slijed SEQ ID NO: 3, je izolirana polinukleotidna molekula, koja sadrži najmanje oko 70 % nukleotidnog slijeda SEQ ID NO: 3, te koja kodira funkcionalni ekvivalent homologa genskog produkta AveC, kao što je definirano neposredno gore.

Ovaj izum također se odnosi na polinukleotidnu molekulu, koja sadrži nukleotidni slijed homologan sa *S. hygroscopicus* nukleotidnim slijedom SEQ ID NO: 3. Izraz "homologan", kada ga se upotrebljava u pogledu

polinukleotidne molekule koja sadrži nukleotidni slijed homologan *S. hygroscopicus* slijedu SEQ ID NO: 3, koji kodira genski produkt homolog AveC, je polinukleotidna molekula nukleotidnog slijeda: (a) koji kodira isti genski produkt kao nukleotidni slijed SEQ ID NO: 3, no uključuje jednu ili više tih izmjena u nukleotidnom slijedu, u skladu s degeneriranošću genetskog koda (npr. degenerirana varijanta); (b) koji hibridizira s komplementom polinukleotidne molekule nukleotidnog slijeda, koji kodira aminokiselinski slijed SEQ ID NO: 4, pod umjereno strogim uvjetima, tj. hibridizacija filterski vezane DNA u 0,5 M NaHPO₄, 7 % SDS, 1 mM EDTA na 65 °C, uz ispiranje u 0,2 × SSC/0,1 % SDS na 42 °C (vidjeti Ausubel i drugi, gore), te kodira funkcionalni ekvivalent genskog produkta homologa AveC, kao što je definirano gore. U poželjnoj izvedbi, homologna molekula polinukleotida hibridizira s komplementom nukleotidnog slijeda SEQ ID NO: 3, koji kodira genski produkt homolog AveC, pod veoma strogim uvjetima, tj. hibridizacija filterski vezane DNA u 0,5 M NaHPO₄, 7 % SDS, 1 mM EDTA na 65 °C, uz ispiranje u 0,1 × SSC/0,1 % SDS na 68 °C (Ausubel i drugi, 1989.), te kodira funkcionalni ekvivalent genskog produkta homolognog AveC, kao što je definirano neposredno gore.

Ovaj izum također se odnosi na polinukleotidnu molekulu, koja sadrži nukleotidni slijed koji kodira polipeptid homologan *S. hygroscopicus* homologu genskog produkta AveC. Kao što se ovdje upotrebljava u pogledu polipeptida homolognih genskom produktu homologu AveC, SEQ ID NO: 4, iz baktrije *S. hygroscopicus*, izraz "homologan" znači polipeptid koji inače ima aminokiselinski slijed SEQ ID NO: 4, s tim što je jedan i više aminokiselinskih ostataka konzervativno supstituiran različitim aminokiselinskim ostatkom, kao što je definirano gore, gdje navedeni aminokiselinski slijed ima najmanje oko 70 %, poželjnije najmanje oko 80 %, te najpoželjnije najmanje oko 90 % istovjetnosti aminokiselinskog slijeda polipeptidu SEQ ID NO: 4, kao što je određeno bilo kojim standardnim algoritmom istovjetnosti aminokiselinskog slijeda, poput algoritma BLASTP (GENBANK, NCBI), te gdje takva konzervativna supstitucija rezultira funkcionalnim ekvivalentom genskog produkta homolognog AveC, kao što je definirano gore.

Ovaj izum također se odnosi na oligonukleotide koji hibridiziraju s polinukleotidnom molekulom, koja sadrži nukleotidni slijed sa Slike 1 (SEQ ID NO: 1) ili SEQ ID NO: 3, ili polinukleotidnom molekulom, koja sadrži nukleotidni slijed koji je komplement nukleotidnog slijeda sa Slike 1 (SEQ ID NO: 1) ili SEQ ID NO: 3. Takvi oligonukleotidi dugi su najmanje oko 10 nukleotida, po mogućnosti dugi od oko 15-30 nukleotida, te hibridiziraju s jednom od gore navedenih polinukleotidnih molekula pod veoma strogim uvjetima, tj. ispiranje u 6 × SSC/0,5 % natrij-pirofosfata na oko 37 °C za oligonukleotide duge oko 14 baza, na 48 °C za oligonukleotide duge oko 17 baza, na oko 55 °C za oligonukleotide duge oko 20 baza, te na oko 60 °C za oligonukleotide duge oko 23 baza. U poželjnoj izvedbi, oligonukleotidi su komplementarni dijelu jedne od gore navedenih polinukleotidnih molekula. Ovi oligonukleotidi korisni su za niz namjena, uključujući kodiranje ili djelovanje kao antisens molekule, korisne u regulaciji gena, ili kao klice prilikom umnožavanja kodirajućih polinukleotidnih molekula za *aveC* ili *aveC* homolog.

Dodatne homologe *aveC* gena može se odrediti u drugim vrstama ili sojevima roda *Streptomyces*, upotrebom ovdje opisanih polinukleotidnih molekula ili oligonukleotida, u sprezi s poznatim tehnikama. Primjerice, oligonukleotidnu molekulu, koja sadrži dio *S. avermitilis* nukleotidnog slijeda sa Slike 1 (SEQ ID NO: 1) ili dio *S. hygroscopicus* nukleotidnog slijeda SEQ NO: 3, može se uočljivo označiti način i upotrijebiti za pregled biblioteke dobivene iz DNA, derivirane iz organizma od interesa. Oštrinu hibridizacijskih uvjeta bira se, uglavnom, prema odnosu referentnog organizma, u ovom slučaju *S. avermitilis* ili *S. hygroscopicus*, prema organizmu od interesa. Prohtjevi za različitim oštrinom uvjeta dobro su poznati stručnjacima u ovom području tehnike, te će se takvi uvjeti predvidljivo mijenjati, ovisno o specifičnim organizmima, iz kojih potječu biblioteka i označeni sljedovi. Takvi oligonukleotidi po mogućnosti su najmanje oko 15 nukleotida dugi i uključuju, npr. one opisane u primjerima niže. Umnažanje gena homologa može se provesti upotrebom ovih i drugih oligonukleotida, uz primjenu standardnih tehnika, poput lančane reakcije polimeraze (*polymerase chain reaction*, PCR), iako su i druge tehnike umnažanja poznate u ovom području tehnike, npr. može se također upotrijebiti lančana reakcija ligaze.

Klonove za koje je opaženo da sadrže nukleotidne sljedove homologa *aveC*, može se testirati na njihovu sposobnost kodiranja funkcionalnog homologa genskog produkta AveC. S tim u vezi, klonove se može podvrgnuti sekvencijskoj analizi, kako bi se odredilo pogodan okvir čitanja, kao i inicijacijske i terminacijske signale. Alternativno ili osim toga, klonirani slijed DNA može se insertirati u pogodan ekspresijski vektor, tj. vektor koji sadrži potrebne elemente za transkripciju i translaciju insertiranog slijeda koji kodira protein. Bilo koji od razolikih sustava domaćin/vektor može se upotrijebiti kao što je opisano niže, uključujući, no ne ograničavajući se na bakterijske sustave, poput plazmidnih, bakteriofagnih ili kozmidnih ekspresijskih vektora. Prikładne stanice domaćina, transformirane takvim vektorima, koji sadrže moguće kodirajuće sljedove homologa *aveC*, može se zatim postupcima, poput HPLC analize produkata fermentacije, analizirati na aktivnost AveC-tipa, kao što je opisano u Poglavlju 7, niže.

Dobivanje i rukovanje polinukleotidnim molekulama, opisanim u ovoj specifikaciji, dio su ovog područja tehnike i može ih se vršiti rekombinantnim tehnikama opisanim, npr. u Maniatis i drugi: "*Molecular Cloning, A Laboratory Manual*", Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY, (1989.); Ausubel i drugi: "*Current Protocols*

In Molecular Biology", Greene Publishing Associates & Wiley Interscience, NY, (1989.); Sambrook i drugi: "Molecular Cloning: A Laboratory Manual", 2. izdanje, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY, (1989.); Innis i drugi: "PCR Strategies", izdavač Academic Press, Inc., San Diego, (1995.); i Erlich: "PCR Technology", izdavač Oxford University Press, New York, (1992.), koji su svi uključeni ovdje kao reference.

Polinukleotidni klonovi koji kodiraju genske produkte AveC ili homologe genskog produkta AveC može se odrediti bilo kojim postupkom poznatim u ovom području tehnike, uključujući, no ne ograničavajući se na postupke navedene u Poglavlju 7, niže. Biblioteke genomske DNA može se pregledavati na kodirajuće sljedove *aveC* i *aveC* homologa tehnikama poput postupaka navedenih u Benton i Davis: "Science", 196: 180, (1977.), za biblioteke bakteriofaga, te u Grunstein i Hogness: "Proc. Natl. Acad. Sci. USA", 72: 3961-3965, (1975.), za biblioteke plazmida. Polinukleotidne molekule, koje sadrže nukleotidne sljedove za koje se zna da uključuju *aveC* ORF, poput onog, npr. u plazmidu pSE186 (ATCC 209604), ili u plazmidu pSE119 (opisan u Poglavlju 7, niže), može se upotrijebiti kao sonde u ovim preglednim eksperimentima. Alternativno, oligonukleotidne sonde može se sintetizirati tako da odgovaraju nukleotidnim sljedovima, izvedenim od djelomičnih ili cjelovitih aminokiselinskih sljedova pročišćenog genskog produkta homologa AveC.

2. Rekombinantni sustavi

2.1. Klonski i ekspresijski vektori

Ovaj izum također se odnosi na rekombinantne klonske vektore i ekspresijske vektore, korisne u kloniranju ili eksprimiranju polinukleotidnih molekula prema ovom izumu, koje sadrže, npr. *aveC* ORF iz bakterije *S. avermitilis* ili ORF bilo kojeg *aveC* homologa. U neograničavajućoj izvedbi, ovaj izum odnosi se na plazmid pSE186 (ATCC 209604), koji sadrži potpuni ORF *aveC* gena iz bakterije *S. avermitilis*.

Sav slijedeći opis u pogledu *aveC* ORF iz bakterije *S. avermitilis*, ili polinukleotidne molekule koja sadrži *aveC* ORF iz bakterije *S. avermitilis* ili njegov dio, ili *S. avermitilis* genski produkt AveC, također se odnosi na *aveC* homologe i genske produkte homologa AveC, ako to nije jasno ili kontekstom navedeno.

Razvijen je niz različitih vektora za specifičnu upotrebu u rodu *Streptomyces*, uključujući fage, plazmide velikog broja kopija, plazmide malog broja kopija, te *E. coli-Streptomyces* taksi-vektore, između ostalog, a bilo koji od navedenih može se upotrijebiti u izvedbi predmetnog izuma. Iz roda *Streptomyces* također je klonirano niz gena otpornosti na lijekove, a neki od ovih gena također su uključeni u vektore kao selektivni markeri. Primjeri vektora koje se trenutno upotrebljava kod roda *Streptomyces* navodi se su, između ostalog, u Hutchinson: "Applied Biochem. Biotech.", 16: 169-190, (1980.).

Rekombinantni vektori prema ovom izumu, osobito ekspresijski vektori, po mogućnosti su tako konstruirani da je kodirajući slijed za polinukleotidnu molekulu prema ovom izumu u operativnoj asocijaciji s jednim ili više regulacijskih elemenata potrebnih za transkripciju i translaciju kodirajućeg slijeda u proizvodnji polipeptida. Kao što se ovdje upotrebljava, izraz "regulacijski element" uključuje, ali nije ograničen na nukleotidne sljedove koji kodiraju inducibilne i neinducibilne promotore, pojačivače, operatore i druge elemente, za koje se u ovom području tehnike zna da služe za poticanje i/ili upravljanje ekspresije kodirajućih polinukleotidnih sljedova. Također, kao što se ovdje upotrebljava, kodirajući slijed je u "operativnoj asocijaciji" s jednim ili više regulacijskih elemenata, gdje regulacijski elementi djelotvorno upravljaju i omogućuju transkripciju kodirajućeg slijeda ili translaciju njegove mRNA, ili oboje.

Tipični plazmidni vektori, koje se može konstruirati da sadrže polinukleotidnu molekulu prema ovom izumu, uključuju pCR-Blunt, pCR2.1 (invitrogen), pGEM3Zf (Promega), te taksi-vektor pWHM3 (Vara i drugi: "J. Bact.", 171: 5872-5881, (1989.)), između mnogih drugih.

Dobro su poznati postupci u tehnici konstrukcije rekombinantnih vektora, koji sadrže određene kodirajuće sljedove u operativnoj asocijaciji s prikladnim regulacijskim elementima, a te se može upotrijebiti u izvedbi predmetnog izuma. Ovi postupci uključuju tehnike rekombinacije *in vitro*, tehnike sinteze, te genetsku rekombinaciju *in vivo*. Vidjeti, npr. tehnike opisane u Maniatis i drugi: (1989.), gore; Ausubel i drugi: (1989.), gore; Sambrook i drugi: (1989.), gore; Innis i drugi: (1995.), gore; i Erlich: (1992.), gore.

Regulacijski elementi ovih vektora mogu se također razlikovati po svojoj snazi i specifičnostima. Ovisno o upotrijebljenom sustavu domaćin/vektor, može se upotrijebiti bilo koje prikladne transkripcijske i translacijske elemente. Neograničavajući primjeri bakterijskih transkripcijskih regulacijskih regija ili promotora uključuju β -gal promotor, T7 promotor, TAC promotor, lijevi i desni λ promotor, trp i lac promotore, fuzijske trp-lac promotore i, specifičnije za rod *Streptomyces*, promotore *ermE*, *melC*, *tipA* itd. U specifičnoj izvedbi opisanoj u Poglavlju 11 niže, konstruiran je ekspresijski vektor, koji sadrži *aveC* ORF, kloniran u susjedstvo snažnog konstitutivnog *ermE* promotora

iz bakterije *Saccharopolyspora erythraea*. Vektor se transformira u bakteriju *S. avermitilis*, a slijedeća HPLC analiza produkata fermentacije pokazala je povećani titar dobivenih avermektina, u usporedbi s dobivanjem od strane istog soja, no koji umjesto toga ekspresira divlji tip *aveC* alela.

- 5 Ekspresijske vektore za fuzijske proteine može se upotrijebiti za ekspresiju fuzijskog proteina genskog produkta AceC. Pročišćeni fuzijski protein može se upotrijebiti u dobivanju antiseruma protiv genskog produkta AveC, radi ispitivanja biokemijskih svojstava genskog produkta AveC, za konstruiranje fuzijskih proteina AveC različitih biokemijske aktivnosti, ili kako bi se pomoglo u određivanju ili pročišćavanju ekspimiranog genskog produkta AveC. Mogući ekspresijski vektori za fuzijske proteine uključuju, ali nisu ograničeni na vektore koji sadrže sljedove koji kodiraju fuzije β -galaktosidaze i *trpE*, fuzije maltoza-vežućeg proteina, fuzije glutation-S-transferaze i fuzije polihistidina (nosive regije). U alternativnoj izvedbi, genski produkt AveC ili njegov dio može se fuzionirati s homologom genskog produkta AveC, ili njegovim dijelom, koji potječe iz druge vrste ili soja roda *Streptomyces*, poput, npr. *S. hygroscopicus* ili *S. griseochromogenes*. U posebnoj izvedbi, opisanoj u Poglavlju 12 niže, te prikazanoj na Slici 7, konstruiran je kimerni plazmid, koji sadrži regiju od 564 bp iz *S. hygroscopicus* ORF *aveC* homologa, koja zamjenjuje homolognu regiju od 564 bp iz *S. avermitilis* *aveC* ORF. Takve hibridne vektore može se transformirati u *S. avermitilis* stanice i testirati radi određivanja njihovog utjecaja, npr. na dobiveni odnos avermektina klasa 2:1.

- Fuzijske proteine AveC može se konstruirati tako da sadrže regiju korisnu za pročišćavanje. Primjerice, fuzije AveC-maltoza-vežući protein može se pročititi amiloznom smolom; fuzijske proteine AveC-glutation-transferaza može se pročititi glutacion-agaroznim zrnima; te AveC-polihistidinske fuzije može se pročititi smolom s dvovalentnim niklom. Alternativno, protutijela protiv proteinskog ili peptidnog nosača može se upotrijebiti u pročišćavanju fuzijskog proteina afinitetnom kromatografijom. Primjerice, nukleotidni slijed koji kodira ciljni epitop monoklonskog protutijela može se ubaciti u ekspresijski vektor, u operativnoj asocijaciji s regulacijskim elementima i tako smjestiti da se ekspimirani epitop fuzionira s AveC polipeptidom. Primjerice, nukleotidni slijed koji kodira FLAGTM epitopni marker (International Biotechnologies Inc.), koji je hidrofilni peptidni marker, može se standardnim tehnikama inserirati u ekspresijski vektor, na točku koja odgovara, npr. karboksilnom kraju AveC polipeptida. Ekspimirani fuzijski produkt epitopa AveC polipeptid-FLAGTM može se zatim detektirati i afinitetno pročititi pomoću tržišno dostupnih antiFLAGTM protutijela.

- Ekspresijski vektor koji kodira fuzijski protein AveC može se također konstruirati tako da sadrži polilinkerske sljedove, koji kodiraju mjesta za cijepanje specifičnim proteazama, tako da se ekspimirani AveC polipeptid može skinuti s nosećeg područja ili fuzijskog partnera, uz obradu specifičnom proteazom. Primjerice, vektor fuzijskog proteina može sadržavati sljedove DNA koji, između ostalog, kodiraju mjesta cijepanja trombinom ili faktorom Xa.

- Signalni slijed uzvodno od, te u okviru čitanja, *aveC* ORF može se ubaciti u ekspresijski vektor poznatim postupcima za izravni promet i lučenje ekspimiranog genskog produkta. Neograničavajući primjeri signalnih sljedova, između ostalog, uključuju one α -faktora, imunoglobulina, proteina vanjske membrane, penicilinaze, te T-staničnih receptora.

- Kako bi se omogućilo selekciju transformiranih stanica domaćina ili transficiranih kloniranjem ili ekspresijskim vektorima prema ovom izumu, može se konstruirati vektor koji također sadrži kodirajući slijed za produkt reporter-gena ili drugi selektibilni marker. Takav kodirajući slijed je po mogućnosti u operativnoj asocijaciji s regulacijskim elementom kodirajućih sljedova, kao što je opisano gore. Reporter-geni korisni u ovom izumu dobro su poznati u ovom području tehnike i uključuju, između ostalog, one koji kodiraju protein zeleno fluoresciraajući protein, luciferazu, *xyE* i tirozinazu. Nukleotidni sljedovi koji kodiraju selektibilne markere dobro su poznati u ovom području tehnike, te uključuju one koji kodiraju genske produkte odgovorne za otpornost na antibiotike ili antimetabolite, ili koji udovoljavaju auktotrofnom zahtjevu. Primjeri takvih sljedova uključuju one koji, između mnogih drugih, kodiraju otpornost na eritromicin, tiostrepton ili kanamicin.

2.2. Transformacija stanica domaćina

- 50 Ovaj izum također se odnosi na transformirane životinjske stanice koje sadrže polinukleotidnu molekulu ili rekombinantni vektor prema ovom izumu, te nove sojeve ili stanične linije koji od njih potječu. Stanice domaćina korisne u praksi izuma su poželjno *Streptomyces* stanice, iako se također može upotrijebiti druge prokariotske stanice ili eukariotske stanice. Takve transformirane stanice domaćina, između ostalog, tipično uključuju, no nisu ograničene na mikroorganizme poput bakterija transformiranih rekombinantnim bakteriofagnim DNA, plazmidnim DNA ili kozmidnim DNA vektorima, ili kvasac transformiran rekombinantnim vektorima.

- Namjena polinukleotidnih molekula prema ovom izumu je funkcionirati u *Streptomyces* stanicama, no može ih se također transformirati u druge bakterijske ili eukariotske stanice, npr. u svrhu kloniranja ili ekspresije. Tipično se može upotrijebiti soj *E. coli*, npr. DH5a soj, dostupan od strane American Type Culture Collection (ATCC), Rockville, MD, USA (pristupni br. 31343), te iz tržišnih izvora (Stratagene). Poželjne eukariotske stanice domaćina uključuju stanice kvasca, iako se također može djelotvorno upotrijebiti i stanice sisavaca ili stanice kukaca.

Rekombinantni ekspresijski vektor prema ovom izumu po mogućnosti se transformira ili transficira u jednu ili više stanica domaćina iz uglavnom homogenih kultura stanica. Ekspresijski vektor općenito se u stanice domaćina uvodi u skladu s poznatim tehnikama, npr. transformacijom protoplasta, taloženjem kalcij-fosfatom, obradom kalcij-kloridom, mikroinjiciranjem, elektroporacijom, transfekcijom rekombiniranim virusom, transfekcijom liposomomima, transfekcijom pomoću DEAE-dekstrana, transdukcijom, konjugacijom, ili bombardiranjem mikroprojektilima. Izbor transformanata može se provesti standardnim postupcima, primjerice selekcijom stanica koje ekspimiraju selektibilni marker, npr. otpornost na antibiotike, skupa s rekombinantnim vektorom, kao što je opisano gore.

Jednom kada se ekspresijski vektor uvede u stanicu domaćina, integracija i održavanje *aveC* kodirajućeg slijeda ili u stanici domaćina ili episomski, može se potvrditi standardnim tehnikama, npr. analizom hibridizacije po Southern-u, analizom restriktionskim enzimima, PCR-analizom, uključujući PCR s reverznom transkriptazom (rt-PCR), ili imunološkim testom, radi uočavanja očekivanog genskog produkta. Stanice domaćina koje sadrže i/ili ekspimiraju kodirajući slijed rekombinantnog *aveC* može se odrediti bilo kojim od najmanje četiri pristupa, dobro poznatih u ovom području tehnike, uključujući: (i) DNA-DNA, DNA-RNA, ili RNA-antisens RNA hibridizaciju; (ii) uočavanje prisustva funkcija "markerskih" gena; (iii) procjenu razine transkripcije, mjereći ekspresiju *aveC*-specifičnih mRNA transkripata u stanici domaćina; i (iv) detekciju prisustva zrelog produkta polipeptida, mjereći, npr. imunotestom ili prisustvom AveC biološke aktivnosti (npr. proizvodnja specifičnih odnosa i količina avermektina indikativnih za AveC aktivnost u npr. *S. avermitilis* stanicama domaćina).

2.3. Ekspresija i karakterizacija rekombinantnog genskog produkta AveC

Jednom kada je kodirajući slijed *aveC* stabilno uveden u prikladnu stanicu domaćina, transformirana stanica domaćina umnaža se kloniranjem, a nastale stanice može se uzgajati pod uvjetima povoljnim za maksimalno dobivanje genskog produkta AveC. Takvi uvjeti tipično uključuju uzgoj stanica do visoke gustoće. Gdje ekspresijski vektor sadrži inducibilni promotor, upotrebljava se, po potrebi, za indukciju ekspresije, prikladne induksijske uvjete, npr. promjenu temperature, iscrpljivanje nutrijenata, dodavanje proizvoljnih induktora (npr. analozi ugljikohidrata, primjerice izopropil- β -D-tiogalaktopiranozid (IPTG)), nakupljanje viška nusprodukata metabolizma, ili slično.

Gdje se ekspimirani genski produkt AveC zadržava unutar stanica domaćina, stanice se prikuplja i lizira, te se produkt izolira i pročišćuje od lizata pod ekstrakcijskim uvjetima poznatim u ovom području tehnike, radi minimaliziranja degradacije proteina, npr. na 4 °C, ili u prisustvu inhibitora proteaze, ili oboje. Gdje se ekspimirani genski produkt AveC luči iz stanica domaćina, može se jednostavno prikupiti iscrpljeni hranjivi medij, te odatle izolirati produkt.

Ekspimirani genski produkt AveC može se izolirati ili uglavnom pročistiti iz stanica lizata ili medija za kulturu, prema okolnostima, upotrebom standardnih postupaka, uključujući, no ne ograničujući se na bilo koju kombinaciju slijedećih postupaka: taloženje amonij-sulfatom, fracioniranje po veličini, ionskoizmjenjivačku kromatografiju, HPLC, centrifugiranje po gustoći, te afinitetnu kromatografiju. Gdje ekspimirani genski produkt AveC pokazuje biološku aktivnost, porast čistoće dobivanja može se pratiti u svakom koraku postupka pročišćavanja, uz upotrebu prikladnog testa. Pokazuje li ekspimirani genski produkt AveC biološku aktivnost ili ne, može se odrediti na osnovu, npr. veličine, ili reaktivnosti s protutijelom, inače specifičnim za AveC, ili prisustvom fuzijskog markera. Kao što se ovdje upotrebljava, genski produkt AveC je "uglavnom pročišćen" kada produkt čini najmanje oko 20 % proteina, težinski, u određenom pripravku. Također, kao što se ovdje upotrebljava, genski produkt AveC je "izoliran", kada produkt čini najmanje oko 80 % proteina, težinski, u određenom pripravku.

Ovaj izum tako pruža rekombinantno ekspimirani izolirani ili uglavnom pročišćeni *S. avermitilis* genski produkt AveC, koji sadrži aminokiselinski slijed, kojeg kodira slijed, s plazmida pSE186 (ATCC 209604), koji kodira genski produkt AveC, ili aminokiselinski slijed sa Slike 1 (SEQ ID NO: 2) ili njegov bitni dio, te njihove homologe.

Ovaj izum također se odnosi na rekombinantno ekspimirani izolirani ili uglavnom pročišćeni *S. hygroscopicus* homolog genskog produkta AveC, koji sadrži aminokiselinski slijed SEQ ID NO: 4 ili njegov bitan dio, te njihove homologe.

Ovaj izum također se odnosi na postupak proizvodnje genskog produkta AveC, koji se sastoji od kultiviranja stanice domaćina transformirane rekombinantnim ekspresijskim vektorom, gdje navedeni vektor sadrži polinukleotidnu molekulu, s nukleotidnim slijedom koji kodira genski produkt AveC, te gdje je navedena polinukleotidna molekula u operativnoj asocijaciji s jednim ili više regulacijskih elemenata, koji kontroliraju ekspresiju polinukleotidne molekule u stanici domaćina, pod uvjetima pogodnim za proizvodnju rekombinantnog genskog produkta AveC, te prikupljanju genskog produkta AveC iz kulture stanica.

Rekombinantno eksprimiran *S. avermitilis* genski produkt AveC koristan je u različite svrhe, uključujući pregled spojeva koji mijenjaju funkciju genskog produkta AveC i time moduliraju biosintezu avermektina, te u dobivanju protutijela usmjerenih protiv genskog produkta AveC.

- 5 Jednom kada se dobije genski produkt AveC dovoljne čistoće, može ga se karakterizirati standardnim postupcima, uključujući SDS-PAGE, kromatografiju izdvajanjem po veličini, analizu aminokiselinskog slijeda, biološku aktivnost u dobivanju prikladnih produkata u biosintetskom putu avermektina itd. Primjerice, aminokiselinski slijed genskog produkta AveC može se odrediti standardnim tehnikama sekvenciranja peptida. Genski produkt AveC može se također karakterizirati analizom hidrofilnosti (vidjeti, npr. Hopp i Woods: "Proc. Natl. Acad. Sci. USA", 78: 3824, (1981.)), ili
- 10 analognim softverskim algoritmima, kako bi se odredilo hidrofobne i hidrofilne regije genskog produkta AveC. Strukturnu analizu može se provesti radi određivanja regija genskog produkta AveC koje tvore sekundarne strukture. Biofizičke postupke, poput rendgenske kristalografije (Engstrom: "Biochem. Exp. Biol.", 11: 7-13, (1974.)), kompjutorskog modeliranja (Fletterick i Zoller: "Current Communications in Molecular Biology", izdavač Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY, (1986.)), te nuklearne magnetne rezonance (NMR), može se upotrijebiti
- 15 za mapiranje i ispitivanje mjesta međudjelovanja između genskog produkta AveC i njegovog supstrata. Informacije dobivene iz ovih studija može se upotrijebiti u odabiru novih mjesta za mutaciju u *aveC* ORF, kako bi se omogućilo rast novih sojeva bakterije *S. avermitilis* poželjnjih karakteristika dobivanja avermektina.

3. Konstrukcija i upotreba AveC mutanata

- 20 Ovaj izum također se odnosi na polinukleotidnu molekulu, koja sadrži nukleotidni slijed koji je inače isti kao *S. avermitilis* *aveC* alel ili njegova degenerirana varijanta, ili slijed, s plazmida pSE186 (ATCC 209604), koji kodira genski produkt AveC ili njegova degenerirana varijanta, ili nukleotidni slijed *aveC* ORF iz bakterije *S. avermitilis*, kao što je prikazan na Slici 1 (SEQ ID NO: 1) ili njegova degenerirana varijanta, no koji također sadrži jednu ili više
- 25 mutacija, tako da stanice *S. avermitilis* soja ATCC 53692, u kojima je divlji tip *aveC* alela inaktiviran i koji eksprimira polinukleotidnu molekulu, koja sadrži mutirani nukleotidni slijed ili njegovu degeneriranu varijantu, daju različiti odnos ili količinu avermektina nego stanice *S. avermitilis* soja ATCC 53692, koje umjesto toga ekspimiraju samo divlji tip *aveC* alela.

- 30 Prema ovom izumu, takve polinukleotidne molekule može se upotrijebiti u dobivanju novih sojeva bakterije *S. avermitilis* koji pokazuju uočljivu promjenu u dobivanju avermektina, u usporedbi s istim sojem, koji umjesto toga eksprimira samo divlji tip *aveC* alela. U poželjnoj izvedbi, takve polinukleotidne molekule korisne su u dobivanju novih sojeva bakterije *S. avermitilis*, koji daju smanjeni odnos avermektina klasa 2:1, u usporedbi s istim sojem, koji umjesto toga eksprimira samo divlji tip *aveC* alela. U daljoj poželjnom ostvarenju, takve polinukleotidne molekule korisne su u
- 35 dobivanju novih sojeva bakterije *S. avermitilis*, koji daju povećane razine avermektina, u usporedbi s istim sojem, koji umjesto toga eksprimira samo divlji tip *aveC* alela. U sljedećoj poželjnoj izvedbi, takve polinukleotidne molekule korisne su u dobivanju novih sojeva bakterije *S. avermitilis*, u kojima je *aveC* gen inaktiviran.

- Mutacije u *aveC* alelu ili kodirajućem slijedu uključuju bilo koje mutacije koje uvode jednu ili više aminokiselinskih delecija, adicija ili supstitucija na genskom produktu AveC, ili koje rezultiraju skraćivanjem genskog produkta AveC, ili bilo koje njihove kombinacije, te koje daju traženi rezultat. Takvi mutirani sljedovi *aveC* alela također teže uključiti bilo koje njihove degenerirane varijante. Primjerice, ovaj izum odnosi se na polinukleotidne molekule, koje sadrže nukleotidni slijed *aveC* alela ili njegove degenerirane varijante, ili slijed, s plazmida pSE186 (ATCC 209604), koji kodira genski produkt AveC ili njegovu degeneriranu varijantu, ili nukleotidni slijed *aveC* ORF iz bakterije *S.*
- 45 *avermitilis*, kao što je prikazano na Slici 1 (SEQ ID NO: 1) ili njegova degenerirana varijanta, ali koji također sadrže jednu ili više mutacija koje kodiraju supstituciju aminokiselinskog ostatka različitim aminokiselinskim ostatkom na odabranim položajima u genskom produktu AveC. U nekim neograničavajućim izvedbama, od kojih su neke navedene niže kao primjeri, takve supstitucije može se provesti na bilo kojim aminokiselinskim položajima genskog produkta AveC, koji odgovaraju aminokiselinskim položajima 38, 48, 55, 89, 99, 111, 136, 138, 139, 154, 179, 228, 230, 238,
- 50 266, 275, 289 ili 298 SEQ ID NO: 2, ili nekoj njihovoj kombinaciji.

- Mutacije u kodirajućem slijedu *aveC* provodi se bilo kojim od niza poznatih postupaka, uključujući upotrebu griješeće PCR, ili kasetne mutageneze. Primjerice, usmjerenu mutagenezu oligonukleotidima može se upotrijebiti za promjenu slijeda *aveC* alel ili ORF na definiran način, npr. da uvođenjem jednog ili više restriksijskih mjesta, ili terminacijskog
- 55 kodona, u specifičnim regijama unutar *aveC* alela ili ORF. Postupke poput onih opisanih u US patentu br. 5.605.793, US patentu br. 5.830.721 i US patentu br. 5.837.458, koji uključuju slučajnu fragmentaciju, ponovljene cikluse mutageneze, te nukleotidno preslagivanje, može se također upotrijebiti u dobivanju velike biblioteke polinukleotida, čiji nukleotidni sljedovi kodiraju mutacije *aveC*.

- 60 Ciljane mutacije mogu biti korisne, osobito gdje služe za promjenu jednog ili više konzervativnih aminokiselinskih ostataka u genskom produktu AveC. Primjerice, usporedba izvedenih aminokiselinskih sljedova genskog produkta

AveC i homologa genskog produkta AveC iz bakterija *S. avermitilis* (SEQ ID NO: 2), *S. griseochromogenes* (SEQ ID NO: 5), te *S. hygroscopicus* (SEQ ID NO: 4), kao što je prikazano na Slici 6, ukazuje na mjesta značajne konzervativnosti aminokiselinskih ostataka između ovih vrsta. Ciljana mutageneza koja uzrokuje promjenu jednog ili više ovih konzervativnih aminokiselinskih ostataka može osobito biti djelotvorna u dobivanju novih mutantnih sojeva, koji pokazuju tražene promjene u dobivanju avermektina.

Slučajna mutageneza može također biti korisna, te je se može provesti izlaganjem stanica bakterije *S. avermitilis* ultraljubičastom zračenju ili rendgenskim zrakama, ili kemijskim mutagenima, poput *N*-metil-*N'*-nitrozogvanidina, etil-metansulfonata, dušičaste kiseline ili dušikovih iperita. Za pregled tehnika mutageneze vidjeti, npr. Ausubel: (1989.), gore.

Jednom kada se dobije mutirane polinukleotidne molekule, pregleda ih se kako bi se odredilo mogu li modulirati biosintezu avermektina u bakteriji *S. avermitilis*. U poželjnoj izvedbi, polinukleotidnu molekulu mutiranog nukleotidnog slijeda ispita se komplementacijom soja bakterije *S. avermitilis* u kojem je *aveC* gen inaktiviran, kako bi se dobilo *aveC* negativnu (*aveC*⁻) pozadinu. U neograničavajućem postupku, mutiranu polinukleotidnu molekulu nadovezuje se u eksprisijski plazmid, u operativnoj asocijaciji s jednim ili više regulacijskih elemenata, gdje plazmid po mogućnosti sadrži jedan ili više gena otpornosti na lijekove, kako bi se omogućilo selekciju transformiranih stanica. Ovaj vektor se zatim poznatim tehnikama transformira u *aveC*⁻ stanice domaćina, te se transformirane stanice selektira i kultivira u prikladnim fermentacijskim medijima, pod uvjetima koji omogućuju ili induciraju proizvodnju avermektina. Produkte fermentacije se zatim analizira pomoću HPLC, kako bi se odredilo sposobnost mutirane polinukleotidne molekule da komplementira stanicu domaćina. Nekoliko vektora koji nose mutirane polinukleotidne molekule koje mogu smanjiti odnos avermektina B2:B1, uključujući pSE188, pSE199, pSE231, pSE239 i pSE290 do pSE297, navodi se kao primjere u Poglavlju 8.3, niže.

Ovaj izum također se odnosi na postupke određivanja mutacija *S. avermitilis* *aveC* ORF, koje mogu promijeniti odnos i/ili količinu dobivenih avermektina. U poželjnoj izvedbi, ovaj izum odnosi se na postupak određivanja mutacija *aveC* ORF, koje mogu promijeniti odnos klasa 2:1 dobivenih avermektina, koji se sastoji u: (a) određivanju odnosa avermektina klasa 2:1, kakav daju stanice soja bakterije *S. avermitilis*, u kojima je nativni *aveC* alel inaktiviran, te gdje se uvodi i ekspirira polinukleotidnu molekulu, koja sadrži nukleotidni slijed koji kodira mutirani genski produkt AveC; (b) određivanju odnosa avermektina klasa 2:1, kakav daju stanice soja bakterije *S. avermitilis* kao u koraku (a), no koje umjesto toga ekspiriraju samo divlji tip *aveC* alela ili *aveC* alel koji sadrži nukleotidni slijed ORF sa Slike 1 (SEQ ID NO: 1) ili njemu homologan nukleotidni slijed; te (c) uspoređivanju odnosa avermektina klasa 2:1, kakav daju *S. avermitilis* stanice iz koraka (a) s odnosom avermektina klasa 2:1, kakav daju *S. avermitilis* stanice iz koraka (b); tako da, ako se odnos avermektina klasa 2:1, kakav daju *S. avermitilis* stanice iz koraka (a), razlikuje od odnosa avermektina klasa 2:1, kakav daju *S. avermitilis* stanice iz koraka (b), mutacija *aveC* ORF, koja može promijeniti odnos avermektina klasa 2:1, je određena. U poželjnoj izvedbi, mutacija smanjuje odnos avermektina klasa 2:1.

U slijedećoj poželjnoj izvedbi, ovaj izum se odnosi na postupak određivanja mutacija *aveC* ORF ili genskih konstrukata koji sadrže *aveC* ORF, koji može promijeniti dobivenu količinu avermektina, koji se sastoji u: (a) određivanju količine avermektina, kakvu daju stanice soja bakterije *S. avermitilis*, u kojem je tu nativni *aveC* alel inaktiviran, te gdje se uvodi i ekspirira polinukleotidna molekula, koja sadrži nukleotidni slijed koji kodira mutirani genski produkt AveC ili sadrži genski konstrukt, koji sadrži nukleotidni slijed koji kodira genski produkt AveC; (b) određivanju količine avermektina, kakvu daju stanice istog soja bakterije *S. avermitilis* kao u koraku (a), no koje umjesto toga ekspiriraju samo divlji tip *aveC* alela ili njemu homologan nukleotidni slijed; te (c) uspoređivanju količine avermektina, kakvu daju *S. avermitilis* stanice iz koraka (a), s količinom avermektina kakvu daju *S. avermitilis* stanice iz koraka (b); tako da ako se količina avermektina kakvu daju *S. avermitilis* stanice iz koraka (a) razlikuje od količine avermektina kakvu daju *S. avermitilis* stanice iz koraka (b), mutacija *aveC* ORF ili genskog konstrukta, koja može promijeniti količinu avermektina, je određena. U poželjnoj izvedbi, mutacija povećava dobivenu količinu avermektina.

Bilo koji od gore navedenih postupaka određivanja mutacija vrši se medijem za fermentacijsku kulturu, po mogućnosti uz dodatak cikloheksankarboksilne kiseline, iako se također može upotrijebiti i druge prikladne masnokiselinske prekursori, poput bilo kojih masnokiselinskih prekursora, navedenih u Tablici 1.

Jednom kad se odredi mutiranu polinukleotidnu molekulu, koja modulira dobivanje avermektina u traženom pravcu, može se odrediti položaj mutacije nukleotidnog slijeda. Primjerice, polinukleotidnu molekulu koja sadrži nukleotidni slijed, koji kodira mutirani genski produkt AveC, može se izolirati pomoću PCR i podvrgnuti sekvencijskoj analizi DNA, uz upotrebu poznatih postupaka. Uspoređujući slijed DNA mutiranog *aveC* alela s onim divljeg tipa *aveC* alela, može se odrediti mutaciju/e odgovornu/e za promjenu dobivanja avermektina. U specifičnim, iako neograničavajućim izvedbama prema ovom izumu, *S. avermitilis* genski produkti AveC, koji sadrže bilo pojedinačne aminokiselinske supstitucije bilo kojim od ostataka 55 (S55F), 138 (S138T), 139 (A139T), ili 230 (G230D), ili dvostruke supstitucije na položajima 138 (S138T) i 139 (A139T ili A139F), rezultiraju promjama u funkciji genskog produkta AveC, tako da je

dobiveni odnos avermektina klasa 2:1 promjenjen (vidjeti Poglavlje 8, niže), gdje navedeni aminokiselinski položaji odgovaraju onim prikazanim na Slici 1 (SEQ ID NO: 2). Osim toga, pokazalo se da slijedećih sedam kombinacija mutacija djelotvorno smanjuju odnos avermektina klasa 2:1: (1) D48E/A89T; (2) S138T/A139T/G179S; (3) Q38P/L136P/E238D; (4) F99S/S138T/A139T/G179S; (5) A139T/M228T; (6) G111V/P289L; (7) A139T/K154E/Q298H. Kao što se ovdje upotrebljava, gore navedene oznake, poput A139T, označuju izvorni aminokiselinski ostatak jednoslovnom oznakom, u ovom primjeru alanin (A), na naznačenom položaju, u ovom primjeru položaj 139 (odnosi se na SEQ ID NO: 2) u polipeptidu, za čim slijedi aminokiselinski ostatak koji zamjenjuje izvorni aminokiselinski ostatak, u ovom primjeru treonin (T). Prema tome, u okvir ovog izuma ulaze polinukleotidne molekule nukleotidnih sljedova koji kodiraju mutirane *S. avermitilis* genske proizvode AveC, koji sadrže aminokiselinske supstitucije ili delecije na jednom ili više aminokiselinskih položaja 38, 48, 55, 89, 99, 111, 136, 138, 139, 154, 179, 228, 230, 238, 266, 275, 289 ili 298 (vidjeti Sliku 1), ili bilo koju njihovu kombinaciju.

U poželjnoj izvedbi, takve mutacije kodiraju aminokiselinske supstitucije, koje se bira između jedne ili više njih, iz grupe koju čine:

- (a) aminokiselinski ostatak Q na položaju 38, kojeg se zamjenjuje s P ili aminokiselinom koja je konzervativna supstitucija za P;
- (b) aminokiselinski ostatak D na položaju 48, kojeg se zamjenjuje s E ili aminokiselinom koja je konzervativna supstitucija za E;
- (c) aminokiselinski ostatak A na položaju 89, kojeg se zamjenjuje s T ili aminokiselinom koja je konzervativna supstitucija za T;
- (d) aminokiselinski ostatak F na položaju 99, kojeg se zamjenjuje s S ili aminokiselinom koja je konzervativna supstitucija za S;
- (e) aminokiselinski ostatak G na položaju 111, kojeg se zamjenjuje s V ili aminokiselinom koja je konzervativna supstitucija za V;
- (f) aminokiselinski ostatak L na položaju 136, kojeg se zamjenjuje s P ili aminokiselinom koja je konzervativna supstitucija za P;
- (g) aminokiselinski ostatak S na položaju 138, kojeg se zamjenjuje s T ili aminokiselinom koja je konzervativna supstitucija za T;
- (h) aminokiselinski ostatak A na položaju 139, kojeg se zamjenjuje s T ili F, ili aminokiselinom koja je konzervativna supstitucija za T ili F;
- (i) aminokiselinski ostatak K na položaju 154, kojeg se zamjenjuje s E ili aminokiselinom koja je konzervativna supstitucija za E;
- (j) aminokiselinski ostatak G na položaju 179, kojeg se zamjenjuje s S ili aminokiselinom koja je konzervativna supstitucija za S;
- (k) aminokiselinski ostatak M na položaju 228, kojeg se zamjenjuje s T ili aminokiselinom koja je konzervativna supstitucija za T;
- (l) aminokiselinski ostatak E na položaju 238, kojeg se zamjenjuje s D ili aminokiselinom koja je konzervativna supstitucija za D;
- (m) aminokiselinski ostatak P na položaju 289, kojeg se zamjenjuje s L ili aminokiselinom koja je konzervativna supstitucija za L; i
- (n) aminokiselinski ostatak Q na položaju 298, kojeg se zamjenjuje s H ili aminokiselinom koja je konzervativna supstitucija za H;

gdje su konzervativne aminokiselinske supstitucije definirane kao u Poglavlju 5.1, gore.

U slijedećoj poželjnoj izvedbi, takve mutacije kodiraju kombinacije aminokiselinskih supstitucija, gdje se kombinaciju supstituiranih aminokiselinskih ostataka bira iz grupe koju čine:

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

U slijedećoj poželjnoj izvedbi, specifične kombinacije mutacija u *aveC* alelu, korisne u smanjenju odnosa avermektina klasa 2:1 prema ovom izumu, bira se između jedne ili više njih, iz grupe koju čine:

- (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; i
- (i) A139/K154E/Q298H.

Ovaj izum također se odnosi na pripravke za dobivanje novih sojeva bakterije *S. avermitilis*, čije stanice sadrže mutirani *aveC* alel, što rezultira promijenjenom u dobivanju avermektina. Primjerice, ovaj izum se odnosi na rekombinantne vektore, koje se može upotrijebiti za ciljanje bilo kojih polinukleotidnih molekula, koje sadrže mutirane sljedove prema ovom izumu, na mjesto *aveC* gena na *S. avermitilis* kromosomu, kako bi ih se bilo insertiralo ili, homolognom rekombinacijom, njima zamijenilo *aveC* ORF ili njegov dio. Prema ovom izumu, međutim, ovdje navedena polinukleotidna molekula, koja sadrži mutirani nukleotidni slijed prema ovom izumu, kada je se insertira u *S. avermitilis* kromosom na mjestu koje nije *aveC* gen, ili kada je se održava episomski u *S. avermitilis* stanicama, može također funkcionirati tako da moduliraju biosintezu avermektina. Stoga se ovaj izum također odnosi na vektore koji sadrže polinukleotidnu molekulu, koja sadrži mutirani nukleotidni slijed prema ovom izumu, gdje se te vektore može upotrijebiti za insertiranje polinukleotidne molekule na mjesto u *S. avermitilis* kromosomu, koje nije *aveC* gen, ili da je se održava episomski.

U poželjnoj izvedbi, ovaj izum se odnosi na vektore genske zamjene, koje se može upotrijebiti za insertiranje mutiranog *aveC* alela, ili njegove degenerirane varijante, u stanice soja bakterije *S. avermitilis*, čime se dobivaju novi sojevi bakterije *S. avermitilis*, čije stanice daju izmijenjeni odnosu avermektina klasa 2:1, u usporedbi sa stanicama istog soja, koje umjesto toga ekspimiraju samo divlji tip *aveC* alela. U poželjnoj izvedbi, odnos avermektina klasa 2:1, kakav daju te stanice je smanjen. Takve vektore genske zamjene može se konstruirati pomoću mutiranih polinukleotidnih molekula prisutnih u ovdje navedenim ekspresijskim vektorima, npr. pSE188, pSE199, te pSE231, gdje se te ekspresijske vektore navodi u Poglavlju 8, niže, kao primjere.

U slijedećoj poželjnoj izvedbi, ovaj se izum odnosi na vektore koje se može upotrijebiti za insertiranje mutiranog *aveC* alela, ili njegove degenerirane varijante, u stanice soja bakterije *S. avermitilis*, kako bi se dobilo nove sojeve stanica, koje daju izmijenjene količine avermektina, u usporedbi sa stanicama istog soja, koje umjesto toga ekspimiraju samo divlji tip *aveC* alela. U poželjnoj izvedbi, količina avermektina, kakvu daju stanice, je povećana. U specifičnoj, iako neograničavajućoj izvedbi, takav vektor također sadrži snažan promotor, što je poznato u ovom području tehnike, npr. snažan konstitutivni *ermE* promotor iz bakterije *Saccharopolyspora erythraea*, smješten uzvodno, te u operativnoj asocijaciji s *aveC* alelom. Takav vektor može biti plazmid pSE189, opisan niže u Primjeru 11, ili ga se može konstruirati iz plazmida pSE189, pomoću mutiranog *aveC* alela.

U slijedećoj poželjnoj izvedbi, ovaj se izum odnosi na vektore genske zamjene, korisne u inaktiviranju *aveC* gena u divljem tipu soja bakterije *S. avermitilis*. U neograničavajućoj izvedbi, takve vektore genske zamjene može se konstruirati pomoću mutirane polinukleotidne molekule, prisutne u plazmidu pSE180 (ATCC 209605), niže navedenom kao primjer u Poglavlju 8.1 (Slika 3). Ovaj izum također se odnosi na vektore genske zamjene, koji sadrže polinukleotidnu molekulu koja sadrži ili se sastoji od nukleotidnih sljedova, koji su prirodno smješteni uz *aveC* gen *in situ* u *S. avermitilis* kromosomu, uključujući, npr. one pobočne nukleotidne sljedove prikazane na Slici 1 (SEQ ID NO: 1), gdje se te vektore može upotrijebiti u deletiranju *S. avermitilis* *aveC* ORF.

Ovaj izum također se odnosi na postupke dobivanja novih sojeva bakterije *S. avermitilis*, koje čine stanice koje ekspimiraju mutirani *aveC* alel i koje daju izmijenjen odnos i/ili količinu avermektina, u usporedbi sa stanicama istog soja bakterije *S. avermitilis*, koje umjesto toga ekspimiraju samo divlji tip *aveC* alela. U poželjnoj izvedbi, ovaj izum odnosi se na postupak dobivanja novih sojeva bakterije *S. avermitilis*, koje čine stanice koje ekspimiraju mutirani *aveC* alel i koje daju izmijenjen odnos avermektina klasa 2:1, u usporedbi sa stanicama istog soja bakterije *S. avermitilis*, koje umjesto toga ekspimiraju samo divlji tip *aveC* alela, kojeg čine stanice soja bakterije *S. avermitilis*, transformirane vektorom koji nosi mutirani *aveC* alel, koji kodira genski produkt koji mijenja odnos avermektina klasa 2:1, kakav daju stanice istog soja bakterije *S. avermitilis*, koje ekspimiraju njegov mutirani *aveC* alel, u usporedbi sa stanicama istog soja, koje umjesto toga ekspimiraju samo divlji tip *aveC* alela, te selekciju transformiranih stanica, koje proizvode avermektine u izmijenjenom odnosu klasa 2:1, u usporedbi sa odnosom klasa 2:1, kakav daju stanice soja koji umjesto toga ekspimiraju samo divlji tip *aveC* alela. U poželjnijoj izvedbi, ovaj izum se odnosi na postupak dobivanja novog soja bakterije *S. avermitilis*, koji čine stanice soja bakterije *S. avermitilis*, transformirane vektorom koji može uvesti mutaciju u *aveC* alel u takvim stanicama, gdje mutacija *aveC* alela rezultira supstitucijom u kodiranom genskom produktu *AveC*, s različitim aminokiselinskim ostatkom na jednom ili više aminokiselinskih položaja, koji odgovaraju aminokiselinskim ostacima 38, 48, 55, 89, 99, 111, 136, 138, 139, 154, 179, 228, 230, 238, 266, 275, 289 ili 298 SEQ ID NO: 2, tako da stanice *S. avermitilis* soja, gdje *aveC* alel je tako mutiran, daju odnos avermektina klasa 2:1 različit

od odnosa kakav daju stanice istog *S. avermitilis* soja, koje umjesto toga ekspimiraju samo divlji tip *aveC* alela. U poželjnoj izvedbi, izmijenjen odnos avermektina klasa 2:1 je smanjen.

Kao što se ovdje upotrebljava, gdje se aminokiselinski ostatak, kojeg kodira *aveC* alel na *S. avermitilis* kromosomu, ili u vektoru ili izoliranoj polinukleotidnoj molekuli prema ovom izumu, navodi kao da "odgovara" određenom aminokiselinskom ostatku u SEQ ID NO: 2, ili gdje se za aminokiselinsku supstituciju navodi da se pojavljuje na određenom položaju, koji "odgovara" onom specifično obročanom aminokiselinskom ostatku u SEQ ID NO: 2, namjera je osvrn na aminokiselinski ostatak na istoj relativnoj lokaciji u genskom produktu AveC, koji stručnjak u ovom području tehnike može brzo odrediti usporedbom s aminokiselinskim slijedom, ovdje prikazanim kao SEQ ID NO: 2.

Ovaj izum također se odnosi na postupke dobivanja novih sojeva, gdje se specifične mutacije u *aveC* alelu, koji kodira određene mutacije, navodi kao osnovne promjene na specifičnim nukleotidnim položajima u *aveC* alelu, koji "odgovaraju" određenim nukleotidnim položajima, kao što je prikazano u SEQ ID NO: 1. Kao što se navodi gore, s osvrtnom na odgovarajuće aminokiseline položaje, gdje se nukleotidni položaj u *aveC* alela navodi kao "odgovarajući" za određeni nukleotidni položaj u SEQ ID NO: 1, namjera je osvrtna na nukleotid na istoj realtivnoj lokaciji u nukleotidnom slijedu *aveC*, koji stručnjak u ovom području tehnike može brzo odrediti usporedbom s nukleotidnim slijedom, ovdje prikazanim kao SEQ ID NO: 1.

U sljedećoj poželjnoj izvedbi, ovaj izum se odnosi na postupak dobivanja novih sojeva bakterije *S. avermitilis*, koje čine stanice koje proizvode izmijenjene količine avermektina, koji se sastoji u transformiranju stanica soja bakterije *S. avermitilis* vektorom koji nosi mutirani *aveC* alel ili genski konstrukt koji sadrži *aveC* alel, čija ekspresija rezultira izmjenom količine avermektina, kakvu daju stanice soja bakterije *S. avermitilis*, koje ekspimiraju mutirani *aveC* alel ili genski konstrukt, u usporedbi sa stanicama istog soja, koje umjesto toga ekspimiraju samo pojedinačni divlji tip *aveC* alela, te selekciji transformiranih stanica koje daju izmijenjenu količinu avermektina, u usporedbi s količinom avermektina kakvu daju stanice soja koji umjesto toga ekspimiraju samo pojedinačni divlji tip *aveC* alela. U poželjnoj izvedbi, količina avermektina proizvedenih u transformiranim stanicama je povećana.

U slijedećoj poželjnoj izvedbi, ovaj izum se odnosi na postupak dobivanja novih sojeva bakterije *S. avermitilis*, čije stanice sadrže inaktivirani *aveC* alel, koji se sastoji u transformiranju stanica soja bakterije *S. avermitilis*, koje eksprimiraju bilo koji *aveC* alel, vektorom koji inaktivira *aveC* alel, te selekciji transformiranih stanica u kojima je *aveC* alel inaktiviran. U poželjnoj, iako neograničavajućoj izvedbi, stanice soja bakterije *S. avermitilis* se transformira vektorom zamjene gena, koji nosi *aveC* alel, inaktiviran mutacijom ili zamjenom dijela *aveC* alela slijedom heterolognog gena, te se selektira transformirane stanice kod kojih je inače nativni *aveC* alel zamijenjen inaktiviranim *aveC* alelom. Inaktiviranje *aveC* alela može se odrediti HPLC analizom produkata fermentacije, kao što je opisano niže. U specifičnoj, iako neograničavajućoj izvedbi, opisanoj niže, *aveC* alel se inaktivira insercijom *ermE* gena iz bakterije *Saccharopolyspora erythraea* u *aveC* ORF.

Ovaj izum također se odnosi na nove sojeve bakterije *S. avermitilis*, koje čine stanice transformirane bilo kojim polinukleotidnim molekulama ili vektorima prema ovom izumu. U poželjnoj izvedbi, ovaj izum se odnosi na nove sojeve bakterije *S. avermitilis*, koje čine stanice koje eksprimiraju mutirani *aveC* alel ili njegovu degeneriranu varijantu umjesto toga, ili također, divlji tip *aveC* alela, gdje stanice novog soja daju izmijenjen odnos avermekтина klasa 2:1, u usporedbi s odnosom avermekтина klasa 2:1, kakav daju stanice istog soja, koje umjesto toga eksprimiraju samo divlji tip *aveC* alela. U poželjnoj izvedbi, izmijenjen odnos klasa 2:1, kakav daju nove stanice, je smanjen. Takvi novi sojevi korisni su u industrijskom dobivanju tržišno poželjnih avermekтина, poput doramektina. U poželjnijoj izvedbi, ovaj se izum odnosi na stanice bakterije *S. avermitilis*, koje sadrže bilo koju od gore navedenih mutacija ili kombinaciju mutacija u *aveC* alelu na nukleotidnim položajima, koji odgovaraju onima navedenim gore ili koji inače kodiraju bilo koju od gore navedenih aminokiselinskih supstitucija u genskom produktu AveC. Iako takve mutacije mogu biti prisutne u takvim stanicama na ekstrakromosomskom elementu, poput plazmida, po mogućnosti su takve mutacije prisutne u *aveC* alelu smještenom na *S. avermitilis* kromosomu. U poželjnoj izvedbi, ovaj izum odnosi se na soj bakterije *Streptomyces avermitilis*, kojeg čine stanice s mutacijom u *aveC* alelu, koji kodira genski produkt AveC, sa supstitucijom na jednom ili više aminokiselinskih položaja, koji odgovaraju aminokiselinskim ostacima 38, 48, 55, 89, 99, 111, 136, 138, 139, 154, 179, 228, 230, 238, 266, 275, 289, ili 298 SEQ ID NO: 2, gdje stanica daje odnos avermekтина klasa 2:1 koji se razlikuje od odnosa kakav daje stanica istog *S. avermitilis* soja, koja eksprimira divlji tip *aveC* alela.

Osnovni cilj ovdje opisanih preglednih testova je određivanje mutiranih alela *aveC* gena, čija ekspresija u *S. avermitilis* stanicama mijenja i, preciznije, smanjuje dobiveni odnos klasa avermektina 2:1. U poželjnoj izvedbi, odnos avermektina B2:B1, kakav daju stanice novog *S. avermitilis* soja prema ovom izumu, koje ekspimiraju mutirani *aveC* alel, ili njegovu degeneriranu varijantu, prema ovom izumu, je oko 1,6:1 ili manji. U poželjnijoj izvedbi, odnos je oko 1:1 ili manji. U poželjnijoj izvedbi, odnos je oko 0,84:1 ili manji. U poželjnijoj izvedbi, odnos je oko 0,80:1 ili manji. U poželjnijoj izvedbi, odnos je oko 0,75:1 ili manji. U poželjnijoj izvedbi, odnos je oko 0,73:1 ili manji. U poželjnijoj

izvedbi, odnos je oko 0,68:1 ili manji. U još poželjnijoj izvedbi, odnos je oko 0,67:1 ili manji. U poželjnijoj izvedbi, odnos je oko 0,57:1 ili manji. U još poželjnijoj izvedbi, odnos je oko 0,53:1 ili manji. U još poželjnijoj izvedbi, odnos je oko 0,42:1 ili manji. U još poželjnijoj izvedbi, odnos je oko 0,40:1 ili manji.

- 5 U specifičnoj izvedbi, opisanoj niže, nove stanice prema ovom izumu daju cikloheksil-B2:cikloheksil-B1 avermektine u odnosu manjem od 1,6:1. U različitoj specifičnoj izvedbi, opisanoj niže, nove stanice prema ovom izumu daju cikloheksil-B2:cikloheksil-B1 avermektine u odnosu od oko 0,94:1. U slijedećoj različitoj specifičnoj izvedbi, opisanoj niže, nove stanice prema ovom izumu daju cikloheksil-B2:cikloheksil-B1 avermektine u odnosu od oko 0,88:1. U slijedećoj različitoj specifičnoj izvedbi, opisanoj niže, nove stanice prema ovom izumu daju cikloheksil 2:cikloheksil-B1 avermektine u odnosu od oko 0,84:1. U još daljnjoj različitoj specifičnoj izvedbi, opisanoj niže, nove stanice prema ovom izumu daju cikloheksil 2:cikloheksil-B1 avermektine u odnosu od oko 0,75:1. U još daljnjoj različitoj specifičnoj izvedbi, opisanoj niže, nove stanice prema ovom izumu daju cikloheksil 2:cikloheksil-B1 avermektine u odnosu od oko 0,73:1. U još daljnjoj različitoj specifičnoj izvedbi, opisanoj niže, nove stanice prema ovom izumu daju cikloheksil 2:cikloheksil-B1 avermektine u odnosu od oko 0,68:1. U još daljnjoj različitoj specifičnoj izvedbi, opisanoj niže, nove stanice prema ovom izumu daju cikloheksil 2:cikloheksil-B1 avermektine u odnosu od oko 0,67:1. U još daljnjoj različitoj specifičnoj izvedbi, opisanoj niže, nove stanice prema ovom izumu daju cikloheksil 2:cikloheksil-B1 avermektine u odnosu od oko 0,57:1. U još daljnjoj različitoj specifičnoj izvedbi, opisanoj niže, nove stanice prema ovom izumu daju cikloheksil 2:cikloheksil-B1 avermektine u odnosu od oko 0,53:1. U još daljnjoj različitoj specifičnoj izvedbi, opisanoj niže, nove stanice prema ovom izumu daju cikloheksil 2:cikloheksil-B1 avermektine u odnosu od oko 0,42:1. U još više daljnjoj različitoj specifičnoj izvedbi, opisanoj niže, nove stanice prema ovom izumu daju cikloheksil 2:cikloheksil-B1 avermektine u odnosu od oko 0,40:1.

U slijedećoj poželjnoj izvedbi, ovaj izum odnosi se na nove sojeve bakterije *S. avermitilis*, koje čine stanice koje eksprimiraju mutirani *aveC* alel ili njegovu degeneriranu varijantu, ili genski konstrukt koji sadrži *aveC* alel ili njegovu degeneriranu varijantu, umjesto, ili uz divlji tip *aveC* alela, gdje stanice novog soja daju izmijenjenu količinu avermektina, u usporedbi sa stanicama istog soja, koje umjesto toga eksprimiraju samo divlji tip *aveC* alela. U poželjnoj izvedbi, novi soj daje povećanu količinu avermektina. U neograničavajućoj izvedbi, genski konstrukt također sadrži snažan promotor, poput snažnog konstitutivnog *ermE* promotora iz bakterije *Saccharopolyspora erythraea*, uzvodno od i u operativnoj asocijaciji s *aveC* ORF.

U slijedećoj poželjnoj izvedbi, ovaj izum odnosi se na nove sojeve bakterije *S. avermitilis*, koje čine stanice u kojima je *aveC* gen inaktiviran. Takvi sojevi su korisni kako u pogledu različitog spektra avermektina koji daju, u usporedbi sa sojem divljeg tipa, tako i komplementacijskim preglednim testovima, kao što je opisano u ovoj specifikaciji, u određivanju utječe li usmjerena ili slučajna mutagenaza *aveC* gena na dobivanje avermektina. U specifičnoj izvedbi, opisanoj niže, *S. avermitilis* stanice domaćina su genetski konstruirane tako da sadrže inaktivirani *aveC* gen. Primjerice, soj SE180-11, opisan niže u primjerima, dobiven je pomoću plazmida za zamjenu gena pSE180 (ATCC 209605) (Slika 3), konstruiranog insercijom *ermE* gena otpornosti u *aveC* kodirajuću regiju radi inaktiviranja *S. avermitilis* *aveC* gena.

Ovaj izum također se odnosi na rekombinantno ekspimirane mutirane *S. avermitilis* genske produkte AveC, koje kodira bilo koja od gore navedenih polinukleotidnih molekula prema ovom izumu, te postupke dobivanje istih.

Ovaj izum također se odnosi na postupak dobivanja avermektina, koji se sastoji u kultiviranju stanica soja bakterije *S. avermitilis*, čije stanice ekspimiraju mutirani *aveC* alel, koji kodira genski produkt koji mijenja odnos klasa avermektina od 2:1, kakav daju stanice soja bakterije *S. avermitilis*, koje ekspimiraju mutirani *aveC* alel, u usporedbi sa stanicama istog soja, koje umjesto toga ekspimiraju samo divlji tip *aveC* alela, u mediju za kulturu, pod uvjetima koji tu omogućuju ili induciraju proizvodnju avermektina, te prikupljanju navedenih avermektina iz kulture. U poželjnoj izvedbi, odnos od 2:1 klasa avermektina, kakav daju stanice u kulturi, koje ekspimiraju mutirani *aveC* alel, je smanjen. Ovaj postupak omogućuje povećanu djelotvornost u dobivanju tržišno važnih avermektina, poput doramektina.

Ovaj izum također se odnosi na postupak dobivanja avermektina, koji se sastoji u kultiviranju stanica soja bakterije *S. avermitilis*, čije stanice ekspimiraju mutirani *aveC* alel ili genski konstrukt koji sadrži *aveC* alel, što rezultira dobivanjem izmijenjene količine avermektina, kakav daju stanice soja bakterije *S. avermitilis*, koje ekspimiraju mutirani *aveC* alel ili genski konstrukt, u usporedbi sa stanicama istog soja, koje ne ekspimiraju mutirani *aveC* alel ili genski konstrukt, već umjesto toga ekspimiraju samo divlji tip *aveC* alela, u mediju za kulturu, pod uvjetima koji tu omogućuju ili induciraju dobivanje avermektina, te prikupljanju navedenih avermektina iz kulture. U poželjnoj izvedbi, povećana je količina avermektina, kakvu daju stanice u kulturi, koje ekspimiraju mutirani *aveC* alel, degeneriranu varijantu ili genski konstrukt.

Ovaj izum također se odnosi na novi pripravak avermektina, koje proizvodi soj bakterije *S. avermitilis*, koji eksprimira mutirani *aveC* alel ili njegovu degeneriranu varijantu, koji kodira genski produkt, koji smanjuje odnos avermektina klasa 2:1, kakav daju stanice soja bakterije *S. avermitilis*, koje ekspimiraju mutirani *aveC* alel ili njegovu degeneriranu

varijantu, u usporedbi sa stanicama istog soja, koje umjesto toga eksprimiraju samo divlji tip *aveC* alela, gdje su avermektini iz novog pripravka dobiveni uz smanjeni odnosa klasa 2:1, u usporedbi s odnosom 2:1 klasa avermektina, kakav daju stanice istog soja bakterije *S. avermitilis*, koje umjesto toga eksprimiraju samo divlji tip *aveC* alela. Novi pripravak avermektina može biti u obliku u kakvom se dobije iz iscrpljene tekućine za fermentacijsku kulturu, ili ga se otud može prikupiti. Novi pripravak avermektina može se poznatim biokemijskim tehnikama pročišćavanja, primjerice taloženjem amonij-sulfatom, dijalizom, frakcioniranjem po veličini, ionskoizmjenjivačkom kromatografijom, s HPLC itd. djelomično ili uglavnom pročistiti iz tekućine za kulturu.

4. Upotrebe avermektina

Avermektini su visoko aktivni antiparazitici, osobito korisni kao anhtelmintici, ektoparazitocidi, insekticidi i akaricidi. Spojevi avermektina, dobiveni u skladu s postupcima prema ovom izumu korisni su za mnoge od ovih svrha. Primjerice, spojevi avermektina, dobiveni prema ovom izumu, korisni su u liječenju raznih bolesti ili stanja kod ljudi, osobito gdje su ove bolesti ili stanja uzrokovani parazitarnim infekcijama, kao što je poznato u ovom području tehnike (vidjeti, npr. Ikeda i Omura: "*Chem. Rev.*", 97(7): 2591-2609, (1997.)). Preciznije, spojevi avermektina, dobiveni prema ovom izumu, djelotvorni su u liječenju niza bolesti ili stanja uzrokovanih endoparazitima, poput parazitskih nematoda, koje mogu inficirati ljude, domaće životinje, svinje, ovce, perad, konje ili stoku.

Specifičnije, spojevi avermektina, dobiveni prema ovom izumu, djelotvorni su protiv nematoda koji inficiraju ljude, kao i onih koje inficiraju razne vrste životinja. Takve nematode uključuju želučanocrijevne parazite, primjerice *Ancylostoma*, *Necator*, *Ascaris*, *Strongyloides*, *Trichinella*, *Capillaria*, *Trichuris*, *Enterobius*, *Dirofilaria*, te parazite nadene u krvi ili drugim tkivima ili organima, poput filarijskih crvića i izlučenih crijevnih stadija nematoda *Strongyloides* i *Trichinella*.

Spojevi avermektina, dobiveni prema ovom izumu, također su korisni i u liječenju ektoparazitskih infekcija, uključujući, npr. infestacije sisavaca i ptica člankonošcima, koje uzrokuju krpelji, grinje, uši, buhe, muhe zujare, kukci koji ujedaju, ili seleće ličinke dvokrilaca, koji, između ostalog, mogu napasti goveda i konje.

Spojevi avermektina, dobiveni prema ovom izumu, također su korisni i kao insekticidi protiv kućne gamadi poput, između ostalog, žohara, suknenog moljca, kožuškara i kućne muhe, kao i kukaca štetnika na uskladištenom žitu i poljoprivrednom bilju, gdje ti štetnici, između ostalog, uključuju paučaste grinje, biljne uši, gusjenice, te ravnokrilce poput skakavaca.

Životinje koje se može liječiti spojevima avermektina, dobivenim prema ovom izumu, uključuju ovce, goveda, konje, jelensku divljač, koze, svinje, ptice, uključujući perad, te pse i mačke.

Avermektinski spoj, dobiven prema ovom izumu, primjenjuje se, u formulaciji prikladnoj za specifično namijenjenu upotrebu, na određenu vrstu životinjskog domadara koju se liječi, te parazita ili kukca u pitanju. Prilikom upotrebe kao parazitocida, avermektinski spoj, dobiven prema ovom izumu, može se primijeniti oralno u obliku kapsule, velike pilule, tablete ili tekućeg pripravka ili, alternativno, može se primijeniti ulijevanjem, ili injekcijom, ili kao implantat. Takve formulacije pripravlja se na konvencionalan način, u skladu sa standardnom veterinarskom praksom. Tako se kapsule, velike pilule ili tablete može pripremiti miješanjem aktivnog sastojka s prikladnim fino razdijeljenim razrjeđivačem ili podlogom, koji također sadrže dezintegrans i/ili vezivo, poput škroba, laktoze, talka, magnezij-stearata, itd. Tekuću formulaciju može se dobiti dispergiranjem aktivnog sastojka u vodenoj otopini s dispergirajućim sredstvom ili močilom, itd. Injektibilne formulacije može se pripremiti u obliku sterilne otopine, koja može sadržavati i druge tvari, npr. dovoljno soli i/ili glukoze za dobivanje otopine izotonične s krvlju.

Težina aktivnog spoja u takvoj formulaciji mijenjat će se ovisno o pacijentu, ili vrsti životinjskog domadara, koje treba liječiti, težini i tipu infekcije, te tjelesnoj težini domaćina. Općenito, prilikom oralne primjene, zadovoljavajuća je doza aktivnog spoja od oko 0,001-10 mg po kg tjelesne težine pacijenta ili životinje, unijeta kao pojedinačna doza ili u podijeljenim dozama, tijekom perioda od 1-5 dana. Međutim, tu može biti slučajeva gdje su u pitanju širi ili uži rasponi doziranja, što određuje npr. liječnik ili veterinar, na osnovu kliničkih simptoma.

Kao alternativa, avermektinski spoj, dobiven prema ovom izumu, može se primjenjivati u kombinaciji sa životinjskim krmivom, te se u tu svrhu može pripremiti koncentrirani aditiv za krmivo ili prethodno pripremljena smjesa za miješanje s normalnim životinjskim krmivom.

Prilikom upotrebe kao insekticid, te prilikom tretiranja poljoprivrednih štetnika, avermektinski spoj, dobiven prema ovom izumu, može se primijeniti u obliku spreja, praška, emulzije i slično, u skladu sa standardnom poljoprivrednom praksom.

PRIMJER:**Fermentacija bakterije *Streptomyces avermitilis* i analiza avermektina B2:B1**

- 5 Vrste kojima nedostaje kako aktivnost dehidrogenaze razgranatih 2-oksokiselina tako i 5-O-metiltransferaze ne proizvode avermektine ako u fermentacijski medij nisu dodane masne kiseline. Ovaj primjer pokazuje da se kod takvih mutanata može dobiti široki raspon odnosa avermektina B2:B1, kada se biosintezu otpočne u prisustvu različitih masnih kiselina.

10 **1. Materijali i postupci**

- 15 *Streptomyces avermitilis* ATCC 53692 skladišti se na -70 °C kao cjeloviti bujon, pripremljen u mediju za nasadivanje, koji sadrži: škrob (Nadex, Laing National), 20 g; Pharmamedia (Trader's Protein, Memphis, TN), 15 g; Ardamine pH (Yeast Products Inc.), 5 g; kalcij-karbonat 1 g. Konačni volumen podesi se vodom iz vodovoda na 1 l, pH podesi na 7,2, a medij 25 minuta autoklavira na 121 °C.

- 20 2 ml otopljene tvari iz prethodnog dobivanja upotrijebi se za nasadivanje tikvice koja sadrži 50 ml istog medija. Nakon 48 sati inkubacije na 28 °C u rotacijskoj tresilici na 180 okretaja u minuti, 2 ml bujona upotrijebi se za nasadivanje tikvice koja sadrži 50 ml produkcijskog medija, koji sadrži: škrob, 80 g; kalcij-karbonat, 7 g; Pharmamedia, 5 g; dikalij-hidrogenfosfat, 1 g; magnezij-sulfat, 1 g; glutaminsku kiselinu, 0,6 g; željezo(II)-sulfat heptahidrat, 0,01 g; cink-sulfat, 0,001 g; mangan(II)-sulfat, 0,001 g. Konačni volumen podesi se vodom iz vodovoda na 1 l, pH podesi na 7,2, a medij 25 minuta autoklavira na 121 °C.

- 25 Različite karboksilnokiselinske supstrate (vidjeti Tablicu 1) otopi se u metanolu i doda u fermentacijski bujon 24 sata nakon nasadivanja, kako bi se dobilo konačnu koncentraciju od 0,2 g/l. Fermentacijski bujon inkubira se 14 dana na 28 °C, zatim se bujon centrifugira (2.500 okretaja u minuti tijekom 2 minute), a supernatant baci. Istaloženi micelij ekstrahira se acetonom (15 ml), zatim diklorometanom (30 ml), te se organska faza odvoji, filtrira, a zatim otpari do suhog. Ostatak se prebaci u metanol (1 ml) i analizira pomoću HPLC, Hewlett-Packard 1090A tekućinskom kromatografom, opremljenim skenirajućim detektorom s poljem dioda, podešenim na 240 nm. Upotrijebljeni stupac je 30 Beckman Ultrasphere C-18, 5 µm, 4,6 mm × 25 cm stupac, održavan na 40 °C. 25 µl Gore navedene metanolne otopine ubrizga se u stupac. Eluciju se provede linearnim gradijentom metanol:vode s 80:20 do 95:5, tijekom 40 minuta, uz protok od 0,85 ml u minuti. Dvije standardne koncentracije cikloheksila B1 upotrijebljene su da se kalibrira odziv detektora, te mjerena je površina ispod krivih za B2 i B1 avermektine.

35 **2. Rezultati**

Vremena zadržavanja tijekom HPLC opažena za B2 i B1 avermektine, te 2:1 odnose, pokazani su u tablici 1.

Tablica 1

40

Supstrat	Vrijeme zadržavanja tijekom HPLC (minuta)		Odnos
	B2	B1	B2:B1
4-tetrahidropirankarboksilna kiselina	8,1	14,5	0,25
izomaslačna kiselina	10,8	18,9	0,5
3-furankarboksilna kiselina	7,6	14,6	0,62
S-(+)-2-metilmaslačna kiselina	12,8	21,6	1,0
cikloheksankarboksilna kiselina	16,9	26,0	1,6
3-tiofenkarboksilna kiselina	8,8	16,0	1,8
ciklopentankarboksilna kiselina	14,2	23,0	2,0
3-trifluormetilmaslačna kiselina	10,9	18,8	3,9
2-metilpentan-kiselina	14,5	24,9	4,2
cikloheptankarboksilna kiselina	18,6	29,0	15,0

- 45 Podaci prikazani u Tablici 1 pokazuju krajnje širok raspon odnosa avermektinskih produkata B2:B1, što ukazuje na značajnu razliku u rezultatima dehidratacije spojeva klase 2 u spojeve klase 1, ovisno o prirodi dodane masnokiselinske polazne jedinice za bočne lance. Ovo ukazuje da promjene u odnosima B2:B1, koje su rezultat promjena u AveC proteinu, mogu biti specifične u određenim supstratima. Samim time, pregled mutanata koji pokazuju promjene odnosa B2:B1, dobivenog pomoću određenog supstrata, treba provesti u prisustvu tog supstrata. U slijedećim primjerima,

opisanim niže, kao pregledni supstrat se upotrebljava cikloheksankarboksilna kiselina. Međutim, ovaj supstrat se upotrebljava samo za prikazivanje mogućnosti, a nije mu cilj ograničiti primjenjivost ovog izuma.

PRIMJER:

5

Izolacija *aveC* gena

10

Ovaj primjer opisuje izolaciju i karakterizaciju regije *Streptomyces avermitilis* kromosoma koja kodira genski produkt AveC. Kao što je prikazano niže, uočeno je da *aveC* gen može modificirati odnos dobivenih cikloheksil-B2 i cikloheksil-B1 (B2:B1) avermektina.

1. Materijali i postupci

1.1. Uzgoj bakterija roda *Streptomyces* za izolaciju DNA

- 5 Upotrijebljen je slijedeći postupak uzgoja bakterija roda *Streptomyces*. Pojedinačne kolonije bakterije *S. avermitilis* ATCC 3172 (izolat pojedinačne kolonije br. 2) izolira se na YPD-6 1/2 jakosti, koji sadrži: Difco ekstrakt kvasca, 5 g; Difco Bacto-peptone, 5 g; glukozu, 2,5 g; MOPS, 5 g; Difco Bacto agar, 15 g. Konačni volumen podesi se s dH₂O na 1 l, pH podesi na 7,0, a medij 25 minuta autoklavira na 121 °C.
- 10 Micelije uzgojene u gore navedenom mediju upotrebljava se za nasadivanje 10 ml TSB medija (Difco Tryptic Soy Broth, 30 g, u 1 l dH₂O, 25 minuta autoklavliranja na 121 °C) u epruveti od 25 × 150 mm, koji se 48-72 sata uz tresenje (300 okretaja u minuti) drži na 28 °C.

1.2. Izolacija kromosomske DNA iz bakterija roda *Streptomyces*

- 15 Alikvot (0,25 ml ili 0,5 ml) micelija uzgojenih, kao što je opisano gore, prebaci se u epruvete za mikrocentrifugiranje od 1,5 ml, a stanice koncentrira centrifugiranjem na 12.000 × g, tijekom 60 sekundi. Supernatant se ukloni, a stanice resuspendira u 0,25 ml TSE pufera (20 ml 1,5 M saharoze, 2,5 ml 1 M Tris-HCl, pH 8,0, 2,5 ml 1 M EDTA, pH 8,0, te 75 ml dH₂O), s 2 mg/ml lizozima. Uzorke se 20 minuta inkubira na 37 °C uz tresenje, prebaci u AutoGen 540™ uređaj za automatsko izoliranje nukleinskih kiselina (Integrated Separation Systems, Natick, MA), a genomsku DNA izolira pomoću Cycle 159 (softverska oprema), u skladu s uputama proizvođača.

- Alternativno, 5 ml micelija prebaci se u epruvetu od 17 × 100 mm, stanice koncentrira centrifugiranjem na 3.000 okretaja u minuti tijekom 5 minuta, a supernatant ukloni. Stanice se resuspendira u 1 ml TSE pufera, koncentrira centrifugiranjem na 3.000 okretaja u minuti tijekom 5 minuta, a supernatant ukloni. Stanice se resuspendira u 1 ml TSE pufera s 2 mg/ml lizozima, te 30-60 minuta inkubira na 37 °C uz tresenje. Nakon inkubacije, doda se 0,5 ml 10 % natrij-dodecil-sulfata (*sodium dodecyl sulfate*, SDS), a stanice inkubira na 37 °C, do završetka lize. Lizat se 10 minuta inkubira na 65 °C, ohladi na sobnu temperaturu, razdijeli u dvije Eppendorf-epruvete od po 1,5 ml, te 1 × ekstrahira s 0,5 ml fenol/kloroforma (50 % fenol prethodno uravnotežen s 0,5 M Tris, pH 8,0, 50 % kloroformom). Vodenu fazu se ukloni i 2-5 × ekstrahira kloroform:izoamil-alkoholom (24:1). DNA se istaloži dodavanjem 1/10 volumena 3 M natrij-acetata, pH 4,8, smjesu 10 minuta inkubira na ledu, 10 minuta centrifugira na 15.000 okretaja u minuti na 5 °C, a supernatant prebaci u čistu epruvetu, u koju se doda 1 volumen izopropanola. Smjesu supernatanta s izopropanolom se zatim 20 minuta inkubira na ledu, 20 minuta centrifugira na 15.000 okretaja u minuti na 5 °C, supernatant ukloni, a talog DNA 1 × ispere 70 % etanolom. Nakon što se talog osuši, DNA se resuspendira u TE puferu (10 mM Tris, 1 mM EDTA, pH 8,0).

1.3. Izolacija plazmidne DNA iz bakterija roda *Streptomyces*

- 40 Alikvot (1,0 ml) micelija prebaci se u epruvete za mikrocentrifugiranje od po 1,5 ml, a stanice se koncentrira centrifugiranjem na 12.000 × g tijekom 60 sekundi. Supernatant se ukloni, stanice resuspendira u 1,0 ml 10,3 % saharoze i koncentrira centrifugiranjem na 12.000 × g tijekom 60 sekundi, a supernatant ukloni. Stanice se zatim resuspendira u 0,25 ml TSE pufera s 2 mg/ml lizozima, te 29 minuta inkubira na 37 °C uz tresenje i prebaci u AutoGen 540™ uređaj za automatsko izoliranje nukleinskih kiselina. Plazmidnu DNA izolira se pomoću Cycle 106 (softverska oprema), u skladu s uputama proizvođača.

- 45 Alternativno, 1,5 ml micelija prebaci se u epruvete za mikrocentrifugiranje od po 1,5 ml, a stanice se koncentrira centrifugiranjem na 12.000 × g tijekom 60 sekundi. Supernatant se ukloni, stanice resuspendira u 1,0 ml 10,3 % saharoze i koncentrira centrifugiranjem na 12.000 × g tijekom 60 sekundi, a supernatant ukloni. Stanice se resuspendira u 0,5 ml TSE pufera s 2 mg/ml lizozima, te 15-30 minuta inkubira na 37 °C. Nakon inkubacije, doda se 0,25 ml alkalnog SDS (0,3 N NaOH, 2 % SDS), a stanice 15-30 minuta inkubira na 55 °C ili do izbistrenja otopine. U otopinu DNA doda se natrij-acetat (0,1 ml, 3 M, pH 4,8), te je se zatim 10 minuta inkubira na ledu. Uzorke DNA centrifugira se 10 minuta na 14.000 okretaja u minuti, na 5 °C. Supernatant se prebaci u čistu epruvetu, te se doda 0,2 ml fenol:kloroforma (50 % fenol:50 % kloroform) i blago promiješa. Otopinu DNA centrifugira se 10 minuta na 14.000 okretaja u minuti, na 5 °C, a gornji sloj prebaci u čistu Eppendorf-epruvetu. Doda se izopropanol (0,75 ml), a otopinu blago promiješa, te zatim 20 minuta inkubira na sobnoj temperaturi. Otopinu DNA centrifugira se 15 minuta na 14.000 okretaja u minuti, na 5 °C, supernatant ukloni, a talog DNA ispere 70 % etanolom, osuši, te resuspendira u TE puferu.

1.4. Izolacija plazmidne DNA iz bakterije *E. coli*

Pojedinačnu transformiranu *E. coli* koloniju nasadi se u 5 ml Luria-Bertani (LB) medij (Bacto-Tryptone, 10 g, Bacto-yeast extract (ekstrakt kvasca), 5 g, te NaCl, 10 g u 1 l dH₂O, pH 7,0, 25 minuta autoklaviranja na 121 °C uz dodatak 100 µg/ml ampicilina). Kulturu se inkubira preko noći, a alikvot od 1 ml prebaci u epruvetu za mikrocentrifugiranje od 1,5 ml. Uzorke kulture prebaci se u AutoGen 540TM uređaj za automatsko izoliranje nukleinskih kiselina, a plazmidnu DNA izolira pomoću Cycle 159 (softverska oprema), u skladu s uputama proizvođača.

1.5. Dobivanje i transformacija *S. avermitilis* protoplasta

Pojedinačne kolonije bakterije *S. avermitilis* izolira se na YPD-6 1/2 jakosti. Micelije se upotrebljava za nasadićvanje 10 ml TSB medija u epruvetu od 25 × 150 mm, koju se zatim nasadi uz tresenje (300 okretaja u minuti) na 28 °C tijekom 48 sati. 1 ml Micelija upotrebljava se za nasadićvanje 50 ml YEME medija. YEME medij sadrži po litri: Difco Yeast Extract, 3 g; Difco Bacto-peptone, 5 g; Difco Malt Extract (ekstrakt slada), 3 g; saharozu 300 g. Nakon 25 minuta autoklaviranja na 121 °C, doda se slijedeće: 2,5 M MgCl₂·6H₂O (zasebno 25 minuta autoklaviran na 121 °C), 2 ml; te glicin (20 %) (filterski steriliziran), 25 ml.

Micelije se 48-72 sata uzgaja na 30 °C, te prikupi centrifugiranjem u epruveti za centrifugiranje od 50 ml (Falcon) na 3.000 okretaja u minuti tijekom 20 minuta. Supernatant se ukloni, a micelije resuspendira u P puferu, koji sadrži: saharozu, 205 g; K₂SO₄, 0,25 g; MgCl₂·6H₂O, 2,02 g; H₂O, 600 ml; K₂PO₄ (0,5 %), 10 ml; otopinu mikroelemenata*, 20 ml; CaCl₂·2H₂O (3,68 %), 100 ml; te MES pufer (1,0 M, pH 6,5), 10 ml. (*Otopina mikroelemenata sadrži po litri: ZnCl₂, 40 mg; FeCl₂·6H₂O, 200 mg; CuCl₂·2H₂O, 10 mg; MnCl₂·4H₂O, 10 mg; Na₂B₄O₇·10H₂O, 10 mg; (NH₄)₆Mo₇O₂₄·4H₂O, 10 mg). pH Se podesi na 6,5, a konačni volumen podesi na 1 l, a medij filtrira u vrućem stanju preko 0,45 µm filtera.

Micelije se istaloži na 3.000 okretaja u minuti tijekom 20 minuta, supernatant ukloni, a micelije resuspendira u 20 ml P pufera s 2 mg/ml lizozima. Micelije se 15 minuta inkubira na 35 °C uz tresenje, te mikroskopski pregleda, kako bi se odredilo doseg nastajanja protoplasta. Kada je nastajanje protoplasta gotovo, protoplaste se 10 minuta centrifugira na 8.000 okretaja u minuti. Supernatant se ukloni, a protoplaste resuspendira u 10 ml P pufera. Protoplaste se 10 minuta centrifugira na 8.000 okretaja u minuti, supernatant ukloni, protoplaste resuspendira u 2 ml P pufera, a približno 1 × 10⁹ protoplasta raspodijeli u kriogene fijeale od po 2,0 ml (Nalgene).

Fijalu s 1 × 10⁹ protoplasta centrifugira se 10 minuta na 8.000 okretaja u minuti, supernatant ukloni, a protoplaste resuspendira u 0,1 ml P pufera. 2-5 µg Transformirajuće DNA doda se protoplastima, nakon čega se odmah dodaje 0,5 ml radnog T pufera. T puferska baza sadrži: PEG-1000 (Sigma), 25 g; saharozu, 2,5 g; H₂O, 83 ml. pH Se podesi na 8,8 s 1 N NaOH (filterski steriliziran), a T pufersku bazu filterski sterilizira i spremi na 4 °C). Radni T pufer, pripravljen na dan upotrebe, bio je T puferska baza, 8,3 ml; K₂PO₄ (4 mM), 1 ml; CaCl₂·2H₂O (5 M), 0,2 ml; te TES (1 M, pH 8), 0,5 ml. Svaki sastojak radnog T pufera je filterski steriliziran.

Unutar 20 sekundi dodavanja T pufera protoplastima, doda se i 1,0 ml P pufera, a protoplaste se 10 minuta centrifugira na 8.000 okretaja u minuti. Supernatant se ukloni, a protoplaste resuspendira u 0,1 ml P pufera. Protoplaste se zatim nasadi na RM14 medije, koji sadrže: saharozu, 205 g; K₂SO₄, 0,25 g; MgCl₂·6H₂O, 10,12 g; glukozu, 10 g; Difco Casamino acids, 0,1 g; Difco Yeast Extract, 5 g; Difco Oatmeal Agar (agar sa zobenim brašnom), 3 g; Difco Bacto Agar, 22 g; dH₂O 800 ml. Otopinu se 25 minuta autoklavira na 121 °C. Nakon autoklaviranja, doda se sterilne matične otopine slijedećeg: K₂PO₄ (0,5 %), 10 ml; CaCl₂·2H₂O (5 M), 5 ml; L-prolin (20 %), 15 ml; MES pufer (1,0 M, pH 6,5), 10 ml; otopina mikroelemenata (isto kao gore), 2 ml; matična otopina cikloheksimida (25 mg/ml), 40 ml; te 1 N NaOH, 2 ml. Po 25 ml RM14 medija stavi se kao alikvot po ploči, a ploče su osuši 24 sata prije upotrebe.

Protoplaste se 20-24 sata inkubira, uz 95 % vlage, na 30 °C. Radi selekcije transformanata otpornih na tiostrepton, 1 ml pufera za prekrivanje, s 125 µg/ml tiostrepton, rasprši se ravnomjerno po RM14 regeneracijskim pločama. Pufer za prekrivanje sadrži na 100 ml: saharozu, 10,3 g; otopinu mikroelemenata (isto kao gore), 0,2 ml; te MES (1 M, pH 6,5) 1 ml. Protoplaste se 7-14 dana inkubira, uz 95 % vlage, na 30 °C, dok kolonije otporne na tiostrepton (Thio^r) ne postanu vidljive.

1.6. Transformacija *Streptomyces lividans* protoplasta

U nekim slučajevima, za transformacije se upotrebljava bakterija *S. lividans* (dobavlja John Innes Institute, Norwich, UK). Postupci i pripravnici potrebni za rast, dobivanje protoplasta i transformiranje bakterije *S. lividans* opisani su u Hopwood i drugi: "Genetic Manipulation of Streptomyces, A Laboratory Manual", John Innes Foundation, Norwich,

UK, (1985.), te ih se provodi kao što je tamo opisano. Plazmidnu DNA izolira se iz *S. lividans* transformanata, kao što je opisano u Poglavlju 7.1.3, gore.

1.7. Analiza fermentacije *S. avermitilis* sojeva

S. avermitilis micelije, 4-7 dana uzgajane na YPD-6 1/2 jakosti, nasadi se u epruvete od 2,54 × 15,24 cm (1 × 6 inch), s 8 ml radnog medija i dvije staklene kuglice veličine 5 mm. Radni medij sadrži: topivi škrob (bilo rijetkokuhani škrob ili KOSO, Japan Com Starch Co., Nagoya), 20 g/l; Pharmamedia, 15 g/l; Ardamine pH, 5 g/l (Champlain Ind., Clifton, NJ); CaCO₃, 2 g/l; 2 bcfa ("bcfa" su razgranate masne kiseline (*branched chain fatty acids*)), konačne koncentracije u mediju od 50 ppm 2-(±)-metilmaslačne kiseline, 60 ppm izomaslačne kiseline i 20 ppm izovalerijanske kiseline. pH Se podesi na 7,2, a medij 25 minuta autoklavira na 121 °C.

Epruvetu se 3 dana trese pod kutem od 17°, na 215 okretaja u minuti, na 29 °C. 2 ml Alikvota kulture za nasadivanje upotrebljava se za nasadivanje *Erlenmeyer*-tikvice od 300 ml, s 25 ml produkcijskog medija, koji sadrži: škrob (bilo rijetko kuhani škrob ili KOSO), 160 g/l; Nutrisoy (Archer Daniels Midland, Decatur, IL) 10 g/l; Ardamine pH, 10 g/l; K₂HPO₄, 2 g/l; MgSO₄·4H₂O, 2 g/l; FeSO₄·7H₂O, 0,02 g/l; MnCl₂, 0,002 g/l; ZnSO₄·7H₂O, 0,002 g/l; CaCO₃, 14 g/l; 2 × bcfa (kao gore); te cikloheksankarboksilnu kiselinu (*cyclohexane carboxylic acid*, CHC) (pripravljena kao 20 %-tna otopina na pH 7,0), 800 ppm. pH Se podesi na 6,9, a medij 25 minuta autoklavira na 121 °C.

Nakon nasadivanja, tikvicu se 12 dana inkubira na 29 °C, uz tresenje na 200 okretaja u minuti. Nakon inkubacije, 2 ml uzorka uzme se iz tikvice, razrijedi s 8 ml metanola, promiješa, a smjesu 10 minuta centrifugira na 1250 × g, radi taloženja detritusa. Supernatant se zatim testira pomoću HPLC, na Beckman Ultrasphere ODS stupcu (25 cm × 4,6 mm unutarnjeg promjera), uz brzinu protoka od 0,75 ml u minuti, te detekciju apsorbancom na 240 nm. Pokretna faza bila je 86/8,9/5,1 metanol/voda/acetonitril.

1.8. Izolacija *S. avermitilis* PKS gena

Načini se kozmidna biblioteka *S. avermitilis* (ATCC 31272, SC-2) kromosomske DNA, te je se hibridizira sa sondom za ketosintazu (*ketosynthase*, KS) načinjenom od fragmenta *Saccharoployspora erythraea* gena za poliketid-sintazu (*polyketide synthase*, PKS). Detaljan opis dobivanja kozmidne biblioteke može se naći u Sambrook i drugi: (1989.), gore. Detaljan opis dobivanja biblioteka *Streptomyces* kromosomske DNA navodi se u Hopwood i drugi: (1985.), gore. Kozmidni klonovi s ketosintaza-hibridizirajućim regijama određeni su hibridizacijom s 2,7 kb *NdeI/Eco47III* fragmentom s pEX26 (ljubaznošću Dr P. Leadlay, Cambridge, UK). Približno 5 ng pEX26 obradi se s *NdeI* i *Eco47III*. Reakcijsku smjesu prebaci se na 0,8 % SeaPlaque GTG agarozni gel (FMC BioProducts, Rockland, ME). 2,7 kb *NdeI/Eco47III* fragmenta izreže se iz gela nakon elektroforeze, a DNA prikupi iz gela pomoću enzima GELaseTM, od strane Epicentre Technologies, prema Brzom Protokolu. 2,7 kb *NdeI/Eco47III* fragment markira se s [α -³²P]dCTP (tetra(trietilamonij) sol [alfa-³²P]-deoksicitidin-5'-trifosfata) (NEN-Dupont, Boston, MA) pomoću BRL Nick Translation System (BRL Life Technologies, Inc., Gaithersburg, MD), u skladu s uputama dobavljača. Tipičnu reakciju provodi se u 0,05 ml volumena. Nakon dodavanja 5 μ l pufera za zaustavljanje, markiranu DNA izdvoji se od neuključenih nukleotida G-25 Sephadex Quick SpinTM stupcem (Boehringer Mannheim), u skladu s uputama dobavljača.

Približno 1800 kozmidnih klonova pregleda se hibridizacijom u koloniji. Nađeno je 10 klonova koji su snažno hibridizirali sa *Sacc. erythraea* KS sondom. *E. coli* kolonije s kozmidnom DNA uzgoji se u LB tekućem mediju, a kozmidnu DNA izolira se iz svake kulture AutoGen 540TM uređajem za automatsko izoliranje nukleinskih kiselina, pomoću Cycle 3 (softverska oprema), u skladu s uputama proizvođača. Mapiranje restriktivnim endonukleazama i analize hibridizacije bugaćenjem po Southern-u otkriva da 5 klonova sadrži preklapajuće kromosomske regije. *S. avermitilis* genomska *BamHI* restriktivska mapa od pet kozmida (npr. pSE65, pSE66, pSE67, pSE68, pSE69) konstruirana je analizom preklapajućih kozmida i hibridizacijama (Slika 4).

1.9. Određivanje DNA koja modulira odnose avermektina B2:B1 i određivanje *aveC* ORF

Upotrijebljeni su slijedeći postupci testiranja supkloniranih fragmenata dobivenih iz pSE66 kozmidnog klona na njihovu sposobnost moduliranja odnosa avermektina B2:B1 kod AveC mutanata. pSE66 (5 μ g) obradi se sa *SacI* i *BamHI*. Reakcijsku smjesu prebaci se na 0,8 % SeaPlaqueTM GTG agarozni gel (FMC BioProducts), 2,9 kb *SacI/BamHI* fragmenta izreže iz gela nakon elektroforeze, a DNA prikupi iz gela pomoću GELaseTM (Epicentre Technologies), prema Brzom Protokolu. Približno 5 μ g taksi-vektora pWHM3 (Vara i drugi: "*J. Bacteriol.*", 171: 5872-5881, (1989.)) obradi se sa *SacI* i *BamHI*. Oko 0,5 μ g 2,9 kb inserta i 0,5 μ g obrađenog pWHM3 promiješa se zajedno i inkubira preko noći s 1 jedinicom ligaze (New England Biolabs, Inc., Beverly, MA) na 15 °C, u ukupnom volumenu od 20 μ l, u skladu s uputama dobavljača. Nakon inkubacije, 5 μ l ligacijske smjese inkubira se 10 minuta na 70 °C, ohladi na sobnu temperaturu, te upotrijebi u transformiranju kompetentnih *E. coli* DH5a stanica (BRL), u skladu s uputama

proizvođača. Plazmidnu DNA izolira se iz transformanata otpornih na ampicilin, a prisustvo 2,9 kb *SacI/BamHI* inserta potvrdi restriksijskom analizom. Ovaj plazmid označen je kao pSE119.

Dobije se protoplaste *S. avermitilis* soja 1100-SC38 (soj kuće Pfizer) i transformira s pSE119, kao što je opisano gore. Soj 1100-SC38 je mutant, koji proizvodi znatno više cikloheksil-B2 oblika avermektina, u usporedbi s cikloheksil-B1 oblikom avermektina, uz dodatak cikloheksankarboksilne kiseline (B2:B1 oko 30:1). pSE119 upotrijebljen za transformiranje *S. avermitilis* protoplasta, izolira se bilo iz *E. coli* soja GM2163 (ljubaznošću Dr B.J. Bachmann, upravitelja, *E. coli* Genetic Stock Center, Yale University), *E. coli* soja DMA (BPL), ili *S. lividans* soja TK64. Transformante soja 1100-SC38 otporne na tiostrepton izolira se i analizira HPLC analizom produkata fermentacije. Transformanti *S. avermitilis* soja 1100-SC38 koji sadrže pSE119 daju izmijenjen odnos cikloheksil-B2:cikloheksil-B1 avermektina od oko 3,7:1 (Tablica 2).

Nakon što je utvrđeno da pSE119 može modulirati odnose avermektina B2:B1 u AveC mutantu, sekvencira se DNA insert. Približno 10 µg pSE119 izolira se kompletno za izoliranje plazmidne DNA (Qiagen, Valencia, CA), u skladu s uputama proizvođača, te sekvencira uređajem ABI 373A Automated DNA Sequencer (Perkin Elmer, Foster City, CA). Podatke o slijedu prikupi se i obradi programima Genetic Computer Group (GCG, Madison, WI). DNA slijed i *aveC* ORF prikazani na Slici 1 (SEQ ID NO: 1).

Novi plazmid, označen kao pSE118, konstruiran je kao što slijedi. Približno 5 µg od pSE66 obradi se s *SphI* i *BamHI*. Reakcijsku smjesu prebaci se na 0,8 % SeaPlaque GTG agarozni gel (FMC BioProducts), 2,8 kb *SphI/BamHI* fragment izreže iz gela nakon elektroforeze, a DNA prikupi iz gela pomoću GELase™ (Epicentre Technologies), prema Brzom Protokolu. Približno 5 µg taksi-vektora pWHM3 obradi se sa *SphI* i *BamHI*. Oko 0,5 µg 2,8 kb inserta i 0,5 µg obrađenog pWHM3 pomiješa se zajedno i inkubira preko noći s 1 jedinicom ligaze (New England Biolabs) na 15 °C, u ukupnom volumenu od 20 µl, u skladu s uputama dobavljača. Nakon inkubacije, 5 µl ligacijske smjese inkubira se 10 minuta na 70 °C, ohladi na sobnu temperaturu, te upotrijebi za transformiranje kompetentnih *E. coli* DH5α stanica, u skladu s uputama proizvođača. Plazmidnu DNA izolira se iz transformanata otpornih na ampicilin, a prisustvo 2,8 kb *SphI/BamHI* inserta potvrdi restriksijskom analizom. Ovaj plazmid označen je kao pSE118. DNA insert u pSE118 i pSE119 preklapa se s približno 838 nukleotida (Slika 4).

Protoplaste *S. avermitilis* soja 1100-SC38 transformira se s pSE118, kao gore. Transformante soja 1100-SC38 otporne na tiostrepton izolira se i analizira HPLC analizom produkata fermentacije. Kod transformanata *S. avermitilis* soja 1100-SC38 koji sadrže pSE118 nisu promijenjeni odnosi avermektin cikloheksil-B2:avermektin cikloheksil-B1, u usporedbi sa sojem 1100-SC38 (Tablica 2).

1.10. Umnažanje *aveC* gena iz *S. avermitilis* kromosomske DNA pomoću PCR

Oko 1,2 kb fragment, koji sadrži *aveC* ORF, izolira se iz *S. avermitilis* kromosomske DNA umnažanjem pomoću PCR, uz upotrebu klica konstruiranih na osnovu gore dobivenog nukleotidnog slijeda *aveC*. Klice za PCR dobavlja Genosys Biotechnologies, Inc. (Texas). Desno usmjerena klica je: 5'-TCACGAAACCGGACACAC-3' (SEQ ID NO: 6); a lijevo usmjerena klica je: 5'-CATGATCGCTGAACCGAG-3' (SEQ ID NO: 7). PCR reakciju provodi se pomoću Deep Vent™ (New England Biolabs), u puferu koji dobavlja proizvođač, u prisustvu 300 µM dNTP, 10 % glicerola, 200 pmol obje klice, 0,1 µg kalupa, te 2,5 jedinica enzima, u konačnom volumenu od 100 µl, u uređaju Perkin-Elmer Cetus thermal cycler. Toplinski profil prvog ciklusa bio je 5 minuta na 95 °C (faza denaturacije), 2 minute na 60 °C (faza zagrijavanja), te 2 minute na 72 °C (faza ekstenzije). Slijedeća 24 ciklusa bila su sličnog toplinskog profila, s tim što je faza denaturacije skraćena na 45 sekundi, a faza zagrijavanja je skraćena na 1 minutu.

Produkt PCR podvrgava se elektroforezi u 1 % agaroznom gelu, uz detekciju jedne vrpce od oko 1,2 kb. Ovu DNA pročisti se iz gela, te ligira (pomoću ligaze) s 25 ng lineariziranog, tupog pCR-Blunt vektora (Invitrogen), u 1:10 molarnom odnosu vektor:insert, u skladu s uputama proizvođača. Ligacijsku smjesu upotrebljava se za transformiranje One Shot™ Competent *E. coli* stanice (kompetencija u 1 pokušaju) (Invitrogen), u skladu s uputama proizvođača. Plazmidnu DNA izolira se iz transformanata otpornih na ampicilin, a prisustvo oko 1,2 kb inserta potvrdi se restriksijskom analizom. Ovaj plazmid označen je kao pSE179.

DNA insert iz pSE179 izolira se obradom s *BamHI/XbaI*, odvoji elektroforezom, pročisti iz gela, te veže s taksi-vektorom pWHM3, kojeg se također obradi s *BamHI/XbaI*, uz koncentraciju ukupne DNA od 1 µg, u 1:5 molarnom odnosu vektor:insert. Ligacijsku smjesu upotrebljava se za transformiranje kompetentnih *E. coli* DH5α stanica, u skladu s uputama proizvođača. Plazmidnu DNA izolira se iz transformanata otpornih na ampicilin, a prisustvo oko 1,2 kb inserta potvrdi se restriksijskom analizom. Ovaj plazmid, označen kao pSE186 (Slika 2, ATCC 209604), transformira se u *E. coli* DM1, a plazmidnu DNA izolira se transformanata otpornih na ampicilin.

2. Rezultati

Uočeno je da 2,9 kb *SacI/BamHI* fragment iz pSE119, kada ga se transformira u *S. avermitilis* soj 1100-SC38, značajno mijenja odnos dobivanja avermektina B2:B1. *S. avermitilis* soj 1100-SC38 normalno ima odnos B2:B1 od oko 30:1, no kada je transformiran vektorom koji sadrži 2,9 kb *SacI/BamHI* fragment, odnos avermektina B2:B1 smanji se na oko 3,7:1. Postfermentacijska analiza kultura transformanata potvrđuje prisustvo transformirajuće DNA.

Sekvenciran je 2,9 kb fragment iz pSE119, te je određen ORF od oko 0,9 kb (Slika 1) (SEQ ID NO: 1), koji sadrži *PstI/SphI* fragment, koji je ranije mutiran drugdje, radi dobivanja samo B2 produkata (Ikeda i drugi: (1995.), gore). Usporedba ovog ORF, ili odgovarajućeg izvedenog polipeptida, s poznatim bazama podataka (GenEMBL, SWISS-PROT) nije pokazala nikakvu visoku homologiju s poznatim DNA ili proteinskim sljedovima.

Tablica 2 prikazuje analizu fermentacije *S. avermitilis* soja 1100-SC38 transformiranog različitim plazmidima.

Tablica 2

<i>S. avermitilis</i> soj (transformirajući plazmid)	Br. testiranih transformanta	Prosječni odnos B2:B1
1100-SC38 (niti jedan)	9	30,66
1100-SC38 (pWHM3)	21	31,3
1100-SC38 (pSE119)	12	3,7
1100-SC38 (pSE118)	12	30,4
1100-SC38 (pSE185)	14	27,9

PRIMJER:

Konstrukcija *S. avermitilis* AveC mutanata

Ovaj primjer opisuje konstrukciju nekoliko različitih *S. avermitilis* AveC mutanata, uz upotrebu gore opisanih priprava i postupaka. Opći opis tehnika uvođenja mutacija u gen kod roda *Streptomyces* opisan je u Kieser i Hopwood: "*Meth. Enzym.*", 204: 430-458, (1991.). Detaljniji opis dan je u Anzal i drugi: "*J. Antibiot.*", XLI(2): 226-233, (1988.), te u Stutzman-Engwall i drugi: "*J. Bacteriol.*", 174(1): 144-154, (1992.). Svi ovi uključeni su ovdje kao reference u svojoj cijelosti.

1. Inaktiviranje *S. avermitilis* aveC gena

AveC mutante koji sadrže inaktivirane *aveC* gene konstruira se pomoću nekoliko postupaka, kao što je detaljno navedeno niže.

U prvom postupku, 640 bp *SphI/PstI* fragment, prema van, u odnosu na *aveC* gen u pSE119 (plazmid opisan u Poglavlju 7.1.9, gore), zamijeni se *ermE* genom (za otpornost na eritromicin) iz bakterije *Sacc. erythraea*. *ermE* Gen izolira se iz pIJ4026 (dobavlja John Innes Institute, Norwich, U.K.; vidjeti također Bibb i drugi: "*Gene*", 41: 357-368, (1985.)), uz obradu restrikcijskim enzimima *BglII* i *EcoRI*, nakon čega slijedi elektroforeza, te ga se pročisti iz gela. Ovaj ~1,7 kb fragment ligira se u pGEM7Zf (Promega), obrađen *BamHI* i *EcoRI*, a ligacijsku smjesu transformira se u kompetentne *E. coli* DH5a stanice, u skladu s uputama proizvođača. Plazmidnu DNA izolira se iz transformanata otpornih na ampicilin, a prisustvo ~1,7 kb inserta potvrdi se restrikcijskom analizom. Ovaj plazmid označen je kao pSE27.

pSE118 (opisan u poglavlju 7.1.9, gore) obradi se s *SphI* i *BamHI*, obradak podvrgne elektroforezi, a ~2,8 kb *SphI/BamHI* insert pročisti iz gela. pSE119 obradi se s *PstI* i *EcoRI*, obradak podvrgne elektroforezi, a ~1,5 kb *PstI/EcoRI* insert pročisti iz gela. Taksi-vektor pWHm3 obradi se s *BamHI* i *EcoRI*. pSE27 obradi se s *PstI* i *SphI*, obradak podvrgne elektroforezi, a ~1,7 kb *PstI/SphI* insert pročisti se iz gela. Sva četiri fragmenta (tj. ~2,8 kb, ~1,5 kb, ~7,2 kb, ~1,7 kb) ligira se zajedno ligacijom na 4 načina. Ligacijsku smjesu transformira se u kompetentne *E. coli* DH5a stanice, u skladu s uputama proizvođača. Plazmidnu DNA izolira se iz transformanata otpornih na ampicilin, a prisustvo ispravnog inserta potvrdi restrikcijskom analizom. Ovaj plazmid označen je kao pSE180 (Slika 3; ATCC 209605).

pSE180 transformira se u bakteriju *S. lividans* TK64, a transformirane kolonije odredi pomoću otpornosti na tiostrepton i eritromicin. pSE180 izolira se iz bakterije *S. lividans* i upotrebljava za transformiranje *S. avermitilis* protoplasta. Određena su četiri *S. avermitilis* transformanta otporna na tiostrepton, dobije se protoplaste, te ih se nasadi na ploče pod neselektivnim uvjetima u RM14 medijima. Nakon regeneriranja protoplasta, pojedinačne kolonije pregleda se na

prisustvo otpornosti na eritromicin i odsustvo otpornosti na tiostrepton, što ukazuje na integraciju inaktiviranog *aveC* gena u kromosom i gubitak slobodnog replikona. Određen je jedan *Erm^r Thio^s* transformant i označen kao soj SE180-11. Ukupnu kromosomsku DNA izolira se iz soja SE180-11, obradi restriktivnim enzimima *Bam*HI, *Hind*III, *Pst*I, ili *Sph*I, obradak podvrgne elektroforezi u 0,8 % agaroznom gelu, prebaci na najlonsku membranu, te hibridizira s *ermE* sondom. Ove analize pokazale su da je integracija u kromosom *ermE* gena otpornosti, uz prateću deleciju 640 bp *Pst*I/*Sph*I fragmenta, protekla kao dvostruki *crossing-over* događaj. HPLC analiza produkata fermentacije soja SE180-11 pokazala je da se normalne avermektine više ne proizvodi (Slika 5A).

U drugom postupku inaktiviranja *aveC* gena, 1,7 kb *ermE* gen ukloni se iz kromosoma *S. avermitilis* soja SE180-11, što rezultira 640 bp *Pst*I/*Sph*I delecijom u *aveC* genu. Plazmid zamjene gena konstruira se na slijedeći način: pSE180 se djelomično obradi s *Xba*I, a ~11,4 kb fragment pročisti iz gela. ~11,4 kb Vrpce nedostaje 1,7 kb *ermE* gen otpornosti. DNA se ligira i transformira u *E. coli* DH5α stanice. Plazmidnu DNA izolira se iz transformanata otpornih na ampicilin, a prisustvo ispravnog inserta potvrdi restriktivskom analizom. Ovaj plazmid, označen kao pSE184, transformira se u bakteriju *E. coli* DM1, a plazmidnu DNA izolira iz transformanata otpornih na ampicilin. Ovaj plazmid upotrebljava se za transformiranje protoplasta *S. avermitilis* soja SE180-11. Dobije se protoplaste transformanata soja SE180-11 otpornih na tiostrepton i nasadi na ploče s RM14 kao pojedinačne kolonije. Nakon regeneriranja protoplasta, pojedinačne kolonije se pregleda na odsustvo kako otpornosti na eritromicin tako i otpornosti na tiostrepton, što ukazuje na integraciju inaktiviranog *aveC* gena u kromosom i gubitak slobodnog replikona koji sadrži *ermE* gen. Određen je jedan *Erm^s Thio^s* transformant i označen kao SE184-1-13. Analiza fermentacije SE184-1-13 pokazuje da se normalne avermektine ne proizvodi i da SE184-1-13 ima isti fermentacijski profil kao SE180-11.

U trećem postupku inaktiviranja gena *aveC*, adicijom pomoću PCR, dva G nakon C na nt položaju (nukleotidni položaj) 471, čime se stvara *Bsp*E1 mjesto, uvodi se pomak okvira čitanja u kromosomski *aveC* gen. Prisustvo konstruiranog *Bsp*E1 mjesta bilo je korisno u detekciji događaja zamjene gena. Konstruirane su klice za PCR radi uvođenja mutacije pomaka okvira čitanja u *aveC* genu, te dobivene od strane Genosys Biotechnologies, Inc. Desno usmjerena klica je: 5'-GGTTCCGGATGCCGTTCTCG-3' (SEQ ID NO: 8), a lijevo usmjerena klica je: 5'-AACTCCGGTCGACTCCCTTC-3' (SEQ ID NO: 9). Uvjeti PCR bili su kao što su opisani u Poglavlju 7.1.10, gore. 666 bp Produkt PCR obradi se s *Sph*I, kako bi se dobilo dva fragmenta od 278 bp odnosno 388 bp. 388 bp Fragment pročisti se iz gela.

Plazmid zamjene gena konstruira se na slijedeći način: taksi-vektor pWHM3 obradi se s *Eco*RI i *Bam*HI. pSE119 obradi se s *Bam*HI, obradak podvrgne elektroforezi, a ~840 bp fragment pročisti iz gela. pSE119 obradi se s *Eco*RI i *Xmn*I, obradak podvrgne elektroforezi, a ~1,7 kb fragment pročisti iz gela. Sva četiri fragmenta (npr. ~7,2 kb, ~840 bp, ~1,7 kb i ~388 bp) ligira se zajedno ligacijom na 4 načina. Ligacijsku smjesu transformira se u kompetentne *E. coli* DH5α stanice. Plazmidnu DNA izolira se iz transformanata otpornih na ampicilin, a prisustvo ispravnog inserta potvrdi restriktivskom analizom i analizom slijeda DNA. Ovaj plazmid, označen kao pSE185, transformira se u bakteriju *E. coli* DM1, a plazmidnu DNA izolira iz transformanata otpornih na ampicilin. Ovaj plazmid upotrebljava se za transformiranje protoplasta *S. avermitilis* soja 1100-SC38. Izolira se transformante soja 1100-SC38 otporne na tiostrepton i analizira HPLC analizom produkata fermentacije. pSE185 ne mijenja značajno odnose avermektina B2:B1 kada ga se transformira u *S. avermitilis* soj 1100-SC38 (Tablica 2).

pSE185 se upotrebljava za transformiranje protoplasta bakterije *S. avermitilis*, radi postizanja mutacije pomaka okvira čitanja u kromosomskom *aveC* genu. Dobije se protoplaste transformanata otpornih na tiostrepton i nasadi na ploče kao pojedinačne kolonije u RM14. Nakon regeneriranja protoplasta, pojedinačne kolonije se pregleda na odsustvo otpornosti na tiostrepton. Izolira se kromosomska DNA iz kolonija osjetljivih na tiostrepton i pomoću PCR pregleda na prisustvo mutacije pomaka okvira čitanja integrirane u kromosomu. PCR klise konstruira se na osnovu nukleotidnog slijeda *aveC*, a dobavlja ih Genosys Biotechnologies, Inc. (Texas). Desno usmjerena klica za PCR je: 5'-GCAAGGATACGGGGACTAC-3' (SEQ ID NO: 10), lijevo usmjerena klica za PCR je: 5'-GAACCGACCGCTGATAC-3' (SEQ ID NO: 11), a uvjeti PCR bili su kao što su opisani u Poglavlju 7.1.10, gore. Dobiveni produkt PCR bio je 543 bp, a nakon obrade s *Bsp*E1 opažena su tri fragmenta od po 368 bp, 96 bp, te 79 bp, što ukazuje na integraciju inaktiviranog *aveC* gena u kromosom i gubitak slobodnog replikona.

Analiza fermentacije *S. avermitilis* mutanata, koji sadrže mutaciju pomaka okvira čitanja u *aveC* genu, ukazuje da se normalne avermektine više ne dobiva, te da ovi mutanti imaju isti HPLC fermentacijski profil kao sojevi SE180-11 i SE184-1-13. Određen je jedan *Thio^s* transformant i označen kao soj SE185-5a.

Osim toga, načinjena je mutacija u *aveC* genu koja mijenja nt položaj 520 s G u A, što rezultira promjenom kodona koji kodira triptofan (W), na položaju 116, u stop-kodon. *S. avermitilis* soj s ovom mutacijom ne proizvodi normalne avermektine i ima isti fermentacijski profil kao sojevi SE180-11, SE184-1-13, te SE185-5a.

Osim toga, načinjene su mutacije u *aveC* genu koje mijenjaju kako: (i) nt položaj 970 s G u A, što mijenja aminokiselinu na položaju 266 iz glicina (G) u aspartat (D), tako i (ii) nt položaj 996 s T u C, što mijenja aminokiselinu na položaju 275 iz tirozina (Y) u histidin (H). *S. avermitilis* soj s ovim mutacijama (G256D/Y275H) ne proizvodi normalne avermektine i ima isti fermentacijski profil kao sojevi SE180-11, SE184-1-13, te SE185-5a.

S. avermitilis *aveC* inaktivacijski mutirani sojevi SE180-11, SE184-1-13, SE185-5a, te drugi navedeni ovdje, osiguravaju pregledne alate za procjenu utjecaja drugih mutacija u *aveC* genu. pSE186, koji sadrži kopiju divljeg tipa *aveC* gena, transformira se u bakteriju *E. coli* DM1, a plazmidnu DNA izolira iz transformanata otpornih na ampicilin. Ovu pSE186 DNA upotrebljava se za transformiranje protoplasta *S. avermitilis* soja SE180-11. Izolira se transformante soja SE180-11 otporne na tiostrepton, odredi prisustvo otpornosti na eritromicin, a Thio^r Erm^r transformante analizira se HPLC analizom produkata fermentacije. Prisustvo funkcionalnog *aveC* gena *in trans* bilo je dovoljno za obnovu normalne proizvodnje avermektina u soju SE180-11 (Slika 5B).

2. Analiza mutacija u *aveC* genu koje mijenjaju odnose klasa B2:B1

Kao što je opisano gore, *S. avermitilis* soj SE180-11, koja sadrži inaktivirani gen, komplementira se transformacijom plazmidom koji sadrži funkcionalni *aveC* gen (pSE186). Soj SE180-11 također se upotrebljava kao soj domaćin u karakterizaciji drugih mutacija u *aveC* genu, kao što je opisano niže.

Kromosomsku DNA izolira se iz soja 1100-SC38, te upotrebljava kao kalup za umnažanje *aveC* gena pomoću PCR. 1,2 kb ORF izolira se umnažanjem pomoću PCR, uz upotrebu klica konstruiranih na osnovu nukleotidnog slijeda *aveC*. Desno usmjerena klica je SEQ ID NO: 6, a lijevo usmjerena klica je SEQ ID NO: 7 (vidjeti Poglavlje 7.1.10, gore). PCR i uvjeti supkloniranja opisani su gore. Analiza slijeda DNA 1,2 kb ORF ukazuje na mutaciju u *aveC* genu, koja mijenja nt položaj 337 s C u T, što mijenja aminokiselinu na položaju 55 iz serina (S) u fenilalanin (F). Gen *aveC* koji sadrži S55F mutaciju supklonira se u pWHM3 radi dobivanja plazmida označenog kao pSE187, kojeg se upotrebljava za transformiranje protoplasta *S. avermitilis* soja SE180-11. Izolira se transformante soja SE180-11 otporne na tiostrepton, odredi prisustvo otpornosti na eritromicin, a Thio^r Erm^r transformante analizira HPLC analizom produkata fermentacije. Prisustvo promjene *aveC* gena koji kodira promjenu aminokiselinskog ostatka 55 (S55F) može obnoviti normalnu proizvodnju avermektina u soju SE180-11 (Slika 5C); međutim, odnos cikloheksil-B2:cikloheksil-B1 bio je oko 26:1, u usporedbi sa sojem SE180-11 transformiranim s pSE186, kod kojeg je odnos B2:B1 bio oko 1,6:1 (Tablica 3), što ukazuje da pojedinačna mutacija (S55F) modulira dobivenu količinu cikloheksil-B2, u odnosu na cikloheksil-B1.

Određena je druga mutacija u *aveC* genu, koja mijenja nt položaj 862 s G u A, što mijenja aminokiselinu na položaju 230 od glicina (G) u aspartat (D). *S. avermitilis* soj s mutacijom (G230D) daje odnos avermektina B2:B1 od oko 30:1.

3. Mutacije koje smanjuju odnos B2:B1

Konstruirano je nekoliko mutacija koje smanjuju dobivenu količinu cikloheksil-B2, u odnosu na cikloheksil-B1, kao što slijedi.

Određena je mutacija u *aveC* genu, koja mijenja nt položaj 588 od G u A, što mijenja aminokiselinu na položaju 139 od alanina (A) u treonin (T). Gen *aveC* koji sadrži A139T mutaciju supklonira se u pWHM3, radi dobivanja plazmida označenog kao pSE188, te koji se upotrebljava za transformiranje protoplasta *S. avermitilis* soja SE180-11. Izolira se transformante soja SE180-11 otporne na tiostrepton, odredi prisustvo otpornosti na eritromicin, a Thio^r Erm^r transformante analizira HPLC analizom produkata fermentacije. Prisustvo mutiranog *aveC* gena, koji kodira promjenu aminokiselinskog ostatka 139 (A139T), može obnoviti proizvodnju avermektina u soju SE180-11 (Slika 5D); međutim, odnos B2:B1 bio je oko 0,94:1, što ukazuje da ova mutacija smanjuje dobivenu količinu cikloheksil-B2, u odnosu na cikloheksil-B1. Ovaj rezultat bio je neočekivan, stoga što objavljeni rezultati, kao i rezultati gore opisanih mutacija, prikazuju samo bilo inaktiviranje *aveC* gena ili povećano dobivanje B2 oblika avermektina, u odnosu na oblik B1 (Tablica 3).

Stoga što mutacija A139T mijenja odnose B2:B1 u pravcu povoljnijeg B1, konstruirana je mutacija koja kodira treonin umjesto serina na aminokiselinskom položaju 138. Stoga se pSE186 obradi s *EcoRI* i klonira u pGEM3Zf (Promega) obrađen s *EcoRI*. Ovaj plazmid, označen kao pSE186a, obradi se s *Apal* i *KpnI*, DNA fragmente razdvoji na agaroznom gelu, a dva fragmenta od po ~3,8 kb i ~0,4 kb pročisti se iz gela. ~1,2 kb DNA insert s pSE186 upotrebljava se kao kalup za PCR, kako bi se uvelo jednu promjenu baze na položaju 585. Konstruirana se klice za PCR kako bi se uvelo mutaciju na nt položaju 585, a dobavlja ih Genosys Biotechnologies, Inc. (Texas). Desno usmjerena klica za PCR je: 5'-GGGGGCGGGCCCCGGGTGCGGAGGCGGAAATGCCCTGGCGACG-3' (SEQ ID NO: 12); a lijevo usmjerena klica za PCR je: 5'-GGAACCGACCGCCTGATACA-3' (SEQ ID NO: 13). PCR reakciju provodi se Advantage GC genomic PCR kompletom (Clontech Laboratories, Palo Alto, CA), u puferu koji dobavlja proizvođač, u prisustvu 200

μM dNTP, 200 pmol obje klice, 50 ng DNA kalupa, 1,0 M GC-Melt i 1 jedinice KlenTaq Polymerase Mix (smjesa s Taq-polimerazom (iz bakterije *Thermus aquaticus*)) u konačnom volumenu od 50 μl. Toplinski profil prvog ciklusa bio je 1 minuta na 94 °C; zatim 25 ciklusa od 30 sekundi na 94 °C i 2 minute na 68 °C; te 1 ciklus od 3 minute na 68 °C. PCR produkt od 295 bp obradi se s *ApaI* i *KpnI*, kako bi se oslobodilo 254 bp fragment, koji se odvoji elektroforezom i pročisti iz gela. Sva tri fragmenta (~3,8 kb, ~0,4 kb i 254 bp) ligira se zajedno u ligiranju na 3 načina. Ligacijsku smjesu transformira se u kompetentne *E. coli* DH5a stanice. Plazmidnu DNA izolira se iz transformanata otpornih na ampicilin, a prisustvo ispravnog inserta potvrdi restrikcijskom analizom. Ovaj plazmid označen je kao pSE198.

pSE198 obradi se s *EcoRI*, klonira u pWHM3 obrađen s *EcoRI*, te transformira u *E. coli* DH5a stanice. Plazmidnu DNA izolira se iz transformanata otpornih na ampicilin, a prisustvo ispravnog inserta potvrdi restrikcijskom analizom i analizom slijeda DNA. Ovu plazmidnu DNA transformira se u bakteriju *E. coli* DM1, plazmidnu DNA izolira iz transformanata otpornih na ampicilin, a prisustvo ispravnog inserta potvrdi restrikcijskom analizom. Ovaj plazmid, označen kao pSE199, upotrebljava se za transformiranje protoplasta *S. avermitilis* soja SE180-11. Izolira se transformante soja SE180-11 otporne na tiostrepton, odredi prisustvo otpornosti na eritromicin, a Thio^r Erm^r transformante analizira HPLC analizom produkata fermentacije. Prisustvo mutiranog *aveC* gena koji kodira promjenu na aminokiselinskom ostatku 138 (S138T) može obnoviti normalnu proizvodnju avermektina u soju SE180-11; međutim, odnos B2:B1 bio je 0,88:1, što ukazuje da ova mutacija smanjuje proizvedenu količinu cikloheksil-B2 u odnosu na cikloheksil-B1 (Tablica 3). Ovaj odnos B2:B1 je čak manji od odnosa 0,94:1 opaženog kod mutacije A139T, dobivene transformacijom soja SE180-11 s pSE188, kao što je opisano gore.

Konstruirana je druga mutacija radi uvođenja treonina na aminokiselinske položaje 138 i 139. ~1,2 kb DNA insert iz pSE185 upotrebljava se kao kalup za PCR. Konstruirane su klice za PCR radi uvođenja mutacija na nt položaje 585 i 588, a dobavlja ih Genosys Biotechnologies, Inc. (Texas). Desno usmjerena klica za PCR je: 5'-GGGGGCGGGCCCCGGGTGCGGAGGCGGAAATGCCGCTGGCGACGACC-3' (SEQ ID NO: 14); a lijevo usmjerena klica za PCR je: 5'-GGAACATCACGGCATTACAC-3' (SEQ ID NO: 15). PCR reakciju provodi se uz neposredno gore opisane uvjete. PCR produkt od 449 bp obradi se s *ApaI* i *KpnI*, kako bi se oslobodilo 254 bp fragment, koji se odvoji elektroforezom i pročisti iz gela. pSE186a obradi se s *ApaI* i *KpnI*, DNA fragmente razdvoji na agaroznom gelu, a dva fragmenta od po ~3,8 kb i ~0,4 kb pročisti iz gela. Sva tri fragmenta (~3,8 kb, ~0,4 kb i 254 bp) ligira se zajedno u ligiranju na 3 načina, a ligacijsku smjesu transformira se u kompetentne *E. coli* DH5a stanice. Plazmidnu DNA izolira se iz transformanata otpornih na ampicilin, a prisustvo ispravnog inserta potvrdi restrikcijskom analizom. Ovaj plazmid označen je kao pSE230.

pSE230 obradi se s *EcoRI*, klonira u pWHM3 obrađen s *EcoRI*, te transformira u *E. coli* DH5a stanice. Plazmidnu DNA izolira se iz transformanata otpornih na ampicilin, a prisustvo ispravnog inserta potvrdi restrikcijskom analizom i analizom slijeda DNA. Ovu plazmidnu DNA transformira se u bakteriju *E. coli* DM1, plazmidnu DNA izolira iz transformanata otpornih na ampicilin, a prisustvo ispravnog inserta potvrdi restrikcijskom analizom. Ovaj plazmid, označen kao pSE231, upotrebljava se za transformiranje protoplasta *S. avermitilis* soja SE180-11. Izolira se transformante SE180-11 otporne na tiostrepton, odredi prisustvo otpornosti na eritromicin, a Thio^r Erm^r transformante analizira fermentacijom. Prisustvo dvostruko mutiranog *aveC* gena, koji kodira S138T/A139T, može obnoviti normalnu proizvodnju avermektina od strane soja SE180-11; međutim, odnos B2:B1 bio je 0,84:1 što ukazuje da ta mutacija također smanjuje dobivenu količinu cikloheksil-B2 u odnosu na cikloheksil-B1 (Tablica 3), uz smanjenja omogućena transformacijom soja SE180-11 s pSE188 ili pSE199, kao što je opisano gore.

Konstruirana je druga mutacija radi daljnjeg smanjenja dobivene količine cikloheksil-B2 u odnosu na cikloheksil-B1. Stoga što mutacije S138T/A139T mijenjaju odnose B2:B1 u povoljnijem B1 smjeru, konstruirana je mutacija radi uvođenja treonina na aminokiselinski položaj 138, te fenilalanina na aminokiselinski položaj 139. ~1,2 kb DNA insert s pSE186 upotrebljava se kao kalup za PCR. Konstruirane su klice za PCR radi uvođenja mutacija na nt položaje 585 (promjena T u A), 588 (promjena G u T), te 589 (promjena G u T), a dobavlja ih Genosys Biotechnologies, Inc. (Texas). Desno usmjerena klica za PCR je: 5'-GGGGGCGGGCCCCGGGTGCGGAGGCGGAAATGCCGCTGGCGACGTTC-3' (SEQ ID NO: 25); i lijevo usmjerena klica za PCR je: 5'-GGAACATCACGGCATTACAC-3' (SEQ ID NO: 15). PCR reakciju provodi se Advantage GC genomic PCR kompletom (Clontech Laboratories, Palo Alto, CA), u puferu koji dobavlja proizvođač, u prisustvu 200 μM dNTP, 200 pmol obje klice, 50 ng DNA kalupa, 1,1 mM Mg-acetata, 1,0 M GC-Melt i 1 jedinice Tth DNA Polymerase (*Thermus thermophilus* DNA-polimeraza) u konačnom volumenu od 50 μl. Toplinski profil prvog ciklusa bio je: 1 minuta na 94 °C; zatim 25 ciklusa od 30 sekundi na 94 °C i 2 minute na 68 °C; te 1 ciklus od 3 minute na 68 °C. PCR produkt od 449 bp obradi se s *ApaI* i *KpnI*, kako bi se oslobodilo 254 bp fragment, koji se odvoji elektroforezom i pročisti iz gela. Sva tri fragmenta (~3,8 kb, ~0,4 kb i 254 bp) ligira se zajedno u ligiranju na 3 načina. Ligacijsku smjesu transformira se u kompetentne *E. coli* DH5a stanice. Plazmidnu DNA izolira se iz transformanata otpornih na ampicilin, a prisustvo ispravnog inserta potvrdi restrikcijskom analizom. Ovaj plazmid označen je kao pSE238.

pSE238 obradi se s *EcoRI*, klonira u pWHM3 obrađen s *EcoRI*, te transformira u *E. coli* DH5 α stanice. Plazmidnu DNA izolira se iz transformanata otpornih na ampicilin, a prisustvo ispravnog inserta potvrdi restrikcijskom analizom i analizom slijeda DNA. Ovu plazmidnu DNA transformira se u bakteriju *E. coli* DM1, plazmidnu DNA izolira iz transformanata otpornih na ampicilin, a prisustvo ispravnog inserta potvrdi restrikcijskom analizom. Ovaj plazmid, označen kao pSE239, upotrebljava se za transformiranje protoplasta *S. avermitilis* soja SE180-11. Izolira se transformante soja SE180-11 otporne na tiostrepton, odredi prisustvo otpornosti na eritromicin, a Thio^r Erm^r transformante analizira HPLC analizom produkata fermentacije. Prisustvo dvostruko mutiranog *aveC* gena, koji kodira S138T/A139F, može obnoviti normalnu proizvodnju avermektina u soju SE180-11; međutim, odnos B2:B1 bio je 0,75:1 što ukazuje da ova mutacija također smanjuje proizvedenu količinu cikloheksil-B2 u odnosu na cikloheksil-B1 (Tablica 3), uz smanjenja omogućena transformacijom soja SE180-11 s pSE188, pSE199, ili pSE231, kao što je opisano gore.

Tablica 3

<i>S. avermitilis</i> soj (transformirajući plazmid)	Br. testiranih transformanata	Relativna koncentracija B2	Relativna koncentracija B1	Prosječni odnos B2:B1
SE180-11 (niti jedan)	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

Tehnikama preslagivanja DNA, kao što je opisano u Stemmer: "Nature", 370: 389-391, (1994.); i Stemmer: "Proc. Natl. Acad. Sci. USA", 91: 10747-10751, (1994.); i također opisano u US patentima br. 5,605,793, 5,811,238, 5,830,721 i 5,837,458, konstruirane su dodatne mutacije radi daljnjeg smanjenja dobivene količine cikloheksil-B2 u odnosu na cikloheksil-B1.

Plazmide s presloženom DNA, koji sadrže mutirane *aveC* gene transformira se u kompetentne *dam dcm E. coli* stanice. Plazmidnu DNA izolira se iz transformanata otpornih na ampicilin, te upotrebljava za transformiranje protoplasta *S. avermitilis* soja SE180-11. Izolira se transformante soja SE180-11 otporne na tiostrepton i pregledava na proizvodnju avermektina, uz odnos cikloheksil-B2:cikloheksil-B1 od 1:1 ili manji. Odredi se DNA slijed plazmidne DNA iz SE180-11 transformanata koji daju avermektine uz odnos B2:B1 od 1:1 ili manji.

Određeno je osam transformanata koji daju smanjene količine cikloheksil-B2 u odnosu na cikloheksil-B1. Najniži odnos B2:B1 postignut kod ovih transformanata bio je 0,4:1 (Tablica 4). Plazmidnu DNA izolira se iz svakog od tih osam transformanata, te je određen slijed DNA, radi određivanja mutacija u *aveC* genu. Mutacije su slijedeće.

pSE290 sadrži 4 nukleotidne mutacije na nt položaju 317 s T u A, na nt položaju 353 s C u A, na nt položaju 438 s G u A, te na nt položaju 1155 s T u A. Promjena nukleotida na nt položaju 317 mijenja aminokiselinu na AA položaju (aminokiselinski položaj) 48 s D u E, a promjena nukleotida na nt položaju 438 mijenja aminokiselinu na AA položaju 89 s A u T. Odnos B2:B1, kakav daju stanice koje nose ovaj plazmid bio je 0,42:1 (Tablica 4).

pSE291 sadrži 4 nukleotidne mutacije na nt položaju 272 s G u A, na nt položaju 585 s T u A, na nt položaju 588 s G u A, te na nt položaju 708 s G u A. Promjena nukleotida na nt položaju 585 mijenja aminokiselinu na AA položaju 138 sa S u T, promjena nukleotida na nt položaju 588 mijenja aminokiselinu na AA položaju 139 s A u T, te promjena nukleotida na nt položaju 708 mijenja aminokiselinu na AA položaju 179 s G u S. Odnos B2:B1, kakav daju stanice koje nose ovaj plazmid bio je 0,57:1 (Tablica 4).

pSE292 sadrži iste četiri nukleotidne mutacije kao pSE290. Odnos B2:B1, kakav daju stanice koje nose ovaj plazmid bio je 0,40:1 (Tablica 4).

pSE293 sadrži 6 nukleotidnih mutacija na nt 24 s A u G, na nt položaju 286 s A u C, na nt položaju 497 s T u C, na nt položaju 554 s C u T, na nt položaju 580 s T u C, te na nt položaju 886 s A u T. Promjena nukleotida na nt položaju 286 mijenja aminokiselinu na AA položaju 38 s Q u P, promjena nukleotida na nt položaju 580 mijenja aminokiselinu na AA položaju 136 s L u P, te promjena nukleotida na nt položaju 886 mijenja aminokiselinu na AA položaju 238 s E u D. Odnos B2:B1, kakav daju stanice koje nose ovaj plazmid bio je 0,68:1 (Tablica 4).

- 5 pSE294 sadrži 6 nukleotidnih mutacija na nt 469 s T u C, na nt položaju 585 s T u A, na nt položaju 588 s G u A, na nt položaju 708 s G u A, na nt položaju 833 s C u T, te na nt položaju 1184 s G u A. Osim toga, nt na položajima 173, 174 i 175 su deletirani. Promjena nukleotida na nt položaju 469 mijenja aminokiselinu na AA položaju 99 s F u S, promjena nukleotida na nt položaju 585 mijenja aminokiselinu na AA položaju 138 sa S u T, promjena nukleotida na nt položaju 588 mijenja aminokiselinu na AA položaju 139 s A u T, te promjena nukleotida na nt položaju 708 mijenja aminokiselinu na AA položaju 179 s G u S. Odnos B2:B1, kakav daju stanice koje nose ovaj plazmid bio je 0,53:1 (Tablica 4).
- 10 pSE295 sadrži 2 nukleotidne mutacije na nt 588 s G u A i na nt 856 s T u C. Promjena nukleotida na nt položaju 588 mijenja aminokiselinu na AA položaju 139 s A u T i promjena nukleotida na nt položaju 856 mijenja aminokiselinu na AA položaju 228 s M u T. Odnos B2:B1, kakav daju stanice koje nose ovaj plazmid bio je 0,80:1 (Tablica 4).
- 15 pSE296 sadrži 5 nukleotidnih mutacija na nt položaju 155 s T u C, na nt položaju 505 s G u T, na nt položaju 1039 s C u T, na nt položaju 1202 s C u T, te na nt položaju 1210 s T u C. Promjena nukleotida na nt položaju 505 mijenja aminokiselinu na AA položaju 111 s G u V, a promjena nukleotida na nt položaju 1039 mijenja aminokiselinu na AA položaju 289 s P u L. Odnos B2:B1, kakav daju stanice koje nose ovaj plazmid bio je 0,73:1 (Tablica 4).
- 20 pSE297 sadrži 4 nukleotidne mutacije na nt položaju 377 od G u T, na nt položaju 588 od G u A, na nt položaju 633 od A u G, te na nt položaju 1067 od A u T. Promjena nukleotida na nt položaju 588 mijenja aminokiselinu na AA položaju 139 od A u T, promjena nukleotida na nt položaju 633 mijenja aminokiselinu na AA položaju 154 od K u E, te promjena nukleotida na nt položaju 1067 mijenja aminokiselinu na AA položaju 298 od Q u H. Odnos B2:B1, kakav daju stanice koje nose ovaj plazmid bio je 0,67:1 (Tablica 4).

25 **Tablica 4**

<i>S. avermitilis</i> soj (transformirajući plazmid)	Br. testiranih transformanata	Relativna koncentracija B2	Relativna koncentracija B1	Prosječni odnos B2:B1
SE180-11 (niti jedan)	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

PRIMJER:**Konstrukcija 5'-delecijskih mutanata**

- 5 Kao što je objašnjeno u Poglavlju 5.1, gore, *S. avermitilis* nukleotidni slijed prikazan na Slici 1 (SEQ ID NO: 1) sadrži četiri različita GTG kodona na bp položajima 42, 174, 177 i 180 koji su potencijalna startna mjesta. Ovo poglavlje opisuje konstrukciju višestrukih delecija 5'-regije *aveC* ORF (Slika 1; SEQ ID NO: 1), kako bi se omogućilo određivanje koji bi od ovih kodona mogli funkcionirati kao startna mjesta u *aveC* ORF za ekspresiju proteina.
- 10 Umnažanjem pomoću PCR, izolirani su fragmenti *aveC* gena, različito deletirani na 5'-kraju, iz *S. avermitilis* kromosomske DNA. Konstruirane su klice za PCR na osnovu slijeda *aveC* DNA, a dobavlja ih Genosys Biotechnologies, Inc. Desno usmjerene klice su 5'-AACCCATCCGAGCCGCTC-3' (SEQ ID NO: 16) (D1F1); 5'-TCGGCCTGCCAACGAAC-3' (SEQ ID NO: 17) (D1F2); 5'-CCAACGAACGTGTAGTAG-3' (SEQ ID NO: 18) (D1F3); te 5'-TGCAGGCGTACGTGTTTCAGC-3' (SEQ ID NO: 19) (D2F2). Lijevo usmjerene klice su
- 15 5'-CATGATCGCTGAACCGA-3' (SEQ ID NO: 20); 5'-CATGATCGCTGAACCGAGGA-3' (SEQ ID NO: 21); te 5'-AGGAGTGTGGTGCGTCTGGA-3' (SEQ ID NO: 22). PCR reakciju provodi se kao što je opisano gore.

PCR produkte razdvoji se elektroforezom u 1 % agaroznom gelu, te se odredi pojedinačne DNA vrpce od ~1,0 kb ili ~1,1 kb. PCR produkte pročisti se iz gela i ligira s 25 ng lineariziranog pCR2.1 vektora (Invitrogen) u 1:10 molarnom odnosu vektor:insert, u skladu s uputama proizvođača. Ligacijske smjese upotrebljava se za transformiranje One Shot™ Competent *E. coli* stanica (Invitrogen), u skladu s uputama proizvođača. Plazmidnu DNA izolira se iz transformanata otpornih na ampicilin, a prisustvo inserta potvrdi restriksijskom analizom i analizom slijeda DNA. Ovi plazmidi označeni su kao pSE190 (dobiven pomoću klice D1F1), pSE191 (dobiven pomoću klice D1F2), pSE192 (dobiven pomoću klice D1F3), te pSE193 (dobiven pomoću klice D2F2).

25 DNA inserte se svakog obradi s *Bam*HI/*Xba*I, razdvoji elektroforezom, pročisti iz gela, te svaki za sebe ligira s taksivektorom pWHM3 obrađenim s *Bam*HI/*Xba*I, uz koncentraciju ukupne DNA od 1 µg u 1:5 molarnom odnosu vektor:insert. Ligacijske smjese upotrebljava se za transformiranje kompetentnih *E. coli* DH5a stanica. Plazmidnu DNA izolira se iz transformanata otpornih na ampicilin, a prisustvo inserta potvrdi restriksijskom analizom. Ove plazmide, označene kao pSE194 (D1F1), pSE195 (D1F2), pSE196 (D1F3), te pSE197 (D2F2), svakog posebno se transformira u

30 *E. coli* soj DM1, plazmidnu DNA izolira iz transformanata otpornih na ampicilin, a prisustvo ispravnog inserta potvrdi restriksijskom analizom. Ovu DNA upotrebljava se za transformiranje protoplasta *S. avermitilis* soja SE180-11. Izolira se transformante soja SE180-11 otporne na tiostrepton, odredi prisustvo otpornosti na eritromicin, te Thio^r Erm^r transformante analizira HPLC analizom produkata fermentacije, kako bi se odredilo koja su GTG mjesta nužna za ekspresiju *aveC*. Rezultati ukazuju da se GTG kodon na položaju 42 može ukloniti bez utjecaja na ekspresiju *aveC*, stoga što svaki od pSE194, pSE195 i pSE196, od kojih svakom nedostaje GTG mjesto na položaju 42, ali koji svi

35 sadrže tri GTG mjesta na položajima 174, 177 i 180, može obnoviti normalnu proizvodnju avermektina kada ih se transformira u SE180-11. Normalnu proizvodnju avermektina ne obnavlja se kada se soj SE180-11 transformira s pSE197, kojem nedostaju sva četiri GTG mjesta (Tablica 5).

40

Tablica 5

<i>S. avermitilis</i> (transformirajući plazmid)	Br. testiranih transformanata	Relativna koncentracija B2	Relativna koncentracija B1	Prosječni odnos B2:B1
SE180-11 (niti jedan)	6	0	0	0
SE180-11 (pWHM3)	6	0	0	0
SE180-11 (pSE186)	6	241	152	1,58
SE180-11 (pSE194)	6	35	15	2,43
SE180-11 (pSE195)	6	74	38	1,97
SE180-11 (pSE196)	6	328	208	1,58
SE180-11 (pSE197)	12	0	0	0

PRIMJER:**Kloniranje homologa *aveC* iz bakterija *S. hygrosopicus* i *S. griseochromogenes***

5 Ovaj izum dopušta određivanje i kloniranje homologa gena *aveC* iz drugih vrsta roda *Streptomyces* koje proizvode avermektin ili milbemicin. Primjerice, kozmidne biblioteke *S. hygrosopicus* (FERM BR-1901) genomske DNA hibridizira se s 1,2 kb sandom iz bakterije *S. avermitilis*, opisanom gore. Opaženo je da se neki kozmidni klonovi snažno hibridiziraju. Kromosomsku DNA izolira se iz ovih kozmida, te se odredi 4,9 kb *KpnI* fragment koji hibridizira s *aveC* sandom. Sekvencirana je DNA, te je opaženo da ORF (SEQ ID NO: 3) ima značajnu homologiju s *aveC* ORF iz bakterije *S. avermitilis*. Aminokiselinski slijed (SEQ ID NO: 4), izveden iz *S. hygrosopicus* homologa *aveC* ORF, prikazan je na Slici 8.

Osim toga, kozmidna biblioteka *S. griseochromogenes* genomske DNA hibridizira se s 1,2 kb *aveC* sandom iz bakterije *S. avermitilis*, opisanom gore. Opaženo je da se neki kozmidni klonovi snažno hibridiziraju. Iz ovih kozmida izolira se kromosomska DNA, te se odredi 5,4 kb *PstI* fragment koji hibridizira s *aveC* sandom. Ovu DNA se sekvencira, te se odredi djelomični ORF homologa *aveC*, koji ima značajnu homologiju s *aveC* ORF iz bakterije *S. avermitilis*. Izvedeni djelomični aminokiselinski slijed (SEQ ID NO: 5) prikazan je na Slici 6.

Analiza DNA i aminokiselinskog slijeda homologa *aveC* iz bakterija *S. hygrosopicus* i *S. griseochromogenes* ukazuje da ova područja dijele značajnu homologiju (~50 % istovjetnosti slijeda na aminokiselinskoj azini), kako međusobno, tako i s *S. avermitilis* *aveC* ORF i genskim produktom AveC (Slika 6).

PRIMJER:**Konstrukcija plazmida s *aveC* genom iza *ermE* promotora**

1,2 kb *aveC* ORF iz pSE186 supklonira se u pSE34, koji je taksi-vektor pWHM3 s 300 bp *ermE* promotorom insertiranim kao *KpnI/BamHI* fragment na *KpnI/BamHI* mjesto na pWHM3 (vidjeti Ward i drugi: "Mol. Gen. Genet.", 203: 468-478, (1986.)). pSE186 obradi se s *BamHI* i *HindIII*, obradak podvrgne elektroforezi, a 1,2 kb fragment izolira iz agaroznog gela i ligira s pSE34 obrađenim s *BamHI* i *HindIII*. Ligacijsku smjesu transformira se u kompetentne *E. coli* DH5a stanice, u skladu s uputama proizvođača. Plazmidnu DNA izolira se iz transformanata otpornih na ampicilin, a prisustvo 1,2 kb inserta potvrdi restriksijskom analizom. Ovaj plazmid, označen kao pSE189, transformira se u bakteriju *E. coli* DM1, a plazmidnu DNA izolira iz transformanata otpornih na ampicilin. Protoplaste *S. avermitilis* soja 1100-SC38 transformira se s pSE189. Izolira se transformante soja 1100-SC38 otporne na tiostrepton, te analizira HPLC analizom produkata fermentacije.

Transformanti *S. avermitilis* soja 1100-SC38 koji sadrže pSE139 imali su izmijenjene odnose dobivenih cikloheksil-B2:cikloheksil-B1 avermektina (oko 3:1), u usporedbi sa sojem 1100-SC38 (oko 34:1), a ukupno dobivanje avermektina povećano je približno 2,4 puta u usporedbi sa sojem 1100-SC38 transformiranim s pSE119 (Tablica 6).

pSE189 se također transformira u protoplaste *S. avermitilis* soja divljeg tipa. Izolira se transformante otporne na tiostrepton, te analizira HPLC analizom produkata fermentacije. Ukupni avermektini koji daje divlji tip bakterije *S. avermitilis*, transformiran s pSE189 povećani su približno 2,2 puta, u usporedbi sa divljim tipom bakterije *S. avermitilis* transformiranim s pSE119 (Tablica 6).

Tablica 6

<i>S. avermitilis</i> soj (transformirajući plazmid)	Br. testiranih transformanata	Relativna [B2]	Relativna [B1]	Relativni ukupni avermektini	Prosječni odnos 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
divlji tip	6	59	42	113	1,41
divlji tip (pSE119)	6	248	151	481	1,64
divlji tip (pSE189)	5	545	345	1071	1,58

PRIMJER:**Kimerni plazmid koji sadrži sljedove kako *S. avermitilis* aveC ORF, tako i *S. hygroscopicus* homologa aveC**

Konstruiran je hibridni plazmid, označen kao pSE350, koji sadrži 564 bp dio *S. hygroscopicus* homologa aveC, koji zamjenjuje 564 bp homologni dio *S. avermitilis* aveC ORF (Slika 7), kao što slijedi. pSE350 Je konstruiran pomoću *Bsa*AI restrikcijskog mjesta, konzerviranog u oba slijeda (aveC položaj 225), te *Kpn*I restrikcijskog mjesta, prisutnog u *S. avermitilis* aveC genu (aveC položaj 810). Mjesto *Kpn*I uvede se u *S. hygroscopicus* DNA pomoću PCR, uz upotrebu desno usmjerene klice za 5'-CTTCAGGTGTACGTGTTTCG-3' (SEQ ID NO: 23) i lijevo usmjerene klice 5'-GAACTGGTACCAGTGCCC-3' (SEQ ID NO: 24) (dobavljač Genosys Biotechnologies), uz gore opisane uvjete PCR. PCR produkt obradi se s *Bsa*AI i *Kpn*I, fragmente razdvoji elektroforezom u 1 % agaroznom gelu, a 564 bp *Bsa*AI/*Kpn*I fragment izolira iz gela. pSE179 (opisan u Poglavlju 7.1.10, gore) obradi se s *Kpn*I i *Hind*III, fragmente razdvoji elektroforezom u 1 % agaroznom gelu, a fragment od ~4,5 kb izolira iz gela. pSE179 obradi se s *Hind*III i *Bsa*AI, fragmente razdvoji elektroforezom u 1 % agaroznom gelu, a ~0,2 kb *Bsa*AI/*Hind*III fragment izolira se iz gela. ~4,5 kb *Hind*III/*Kpn*I fragment, ~0,2 kb *Bsa*AI/*Hind*III fragment, te 564 bp *Bsa*AI/*Kpn*I fragment iz bakterije *S. hygroscopicus* ligira se zajedno u ligiranju na 3 načina, a ligacijsku smjesu transformira u kompetentne *E. coli* DH5a stanice. Plazmidnu DNA izolira se iz transformanata otpornih na ampicilin, a prisustvo ispravnog inserta potvrdi restrikcijskom analizom pomoću *Kpn*I i *Ava*I. Ovaj plazmid obradi se s *Hind*III i *Xba*I, kako bi se oslobodilo 1,2 kb insert, koji se zatim ligira s pWHM3 obrađenim s *Hind*III i *Xba*I. Ligacijsku smjesu transformira se u kompetentne *E. coli* DH5a stanice, plazmidnu DNA izolira iz transformanata otpornih na ampicilin, a prisustvo ispravnog inserta potvrdi restrikcijskom analizom pomoću *Hind*III i *Ava*I. Ovu plazmidnu DNA transformira se u bakteriju *E. coli* DM1, plazmidnu DNA izolira iz transformanata otpornih na ampicilin, a prisustvo ispravnog inserta potvrdi restrikcijskom analizom i analizom slijeda DNA. Ovaj plazmid označen je kao pSE350 i upotrebljava se za transformiranje protoplasta *S. avermitilis* soja SE180-11. Izolira se transformante soja SE180-11 otporne na tiostrepton, odredi prisustvo otpornosti na eritromicin, a Thio^r Erm^r transformante analizira HPLC analizom produkata fermentacije. Rezultati ukazuju da transformanti koji sadrže *S. avermitilis*/*S. hygroscopicus* hibridni plazmid imaju prosječni odnos B2:B1 od oko 109:1 (Tablica 7).

Tablica 7

<i>S. avermitilis</i> (transformirajući plazmid)	Br. testiranih transformanata	Relativna koncentracija B2	Relativna koncentracija B1	Prosječni odnos B2:B1
SE180-11 (niti jedan)	8	0	0	0
SE180-11 (pWHM3)	8	0	0	0
SE180-11 (pSE350)	16	233	2	109

DEPOZIT BIOLOŠKIH MATERIJALA

Slijedeći biološki materijal deponiran je u American Type Culture Collection (ATCC) (Kolekcija američkog tipa kultura), 12301 Parklawn Drive, Rockville, MD, 20852, USA, 29. siječnja 1998., uz dodjelu slijedećih pristupnih brojeva:

<u>Plazmid</u>	<u>Pristupni br.</u>
plazmid pSE180	209605
plazmid pSE186	209604

Svi ovdje navedeni patentni, patentne prijave i patentne objave uključeni su kao referenca u svojoj cijelosti.

Opseg ovog izuma nije ograničen specifičnom ovdje opisanom izvedbom, čija je namjena pojedinačna ilustracija pojedinačnih aspekata ovog izuma, a funkcionalno ekvivalentni postupci i komponente ulaze u opseg ovog izuma. Odsta, različite modifikacije izuma, uz one prikazane i ovdje opisane biti će jasne stručnjacima iz ove specifikacije i pratećih slika. Namjera je da takve modifikacije uđu u opseg pridruženih patentnih zahtjeva.

PATENTNI ZAHTEJEVI

1. Polinukleotidna molekula, **naznačena time** što sadrži nukleotidni slijed, koji je inače isti kao *Streptomyces avermitilis* aveC alel, slijed, s plazmida pSE186 (ATCC 209604), koji kodira *S. avermitilis* genski produkt AveC ili nukleotidni slijed aveC ORF iz bakterije *S. avermitilis*, kao što je prikazano na Slici 1 (SEQ ID NO: 1), ili njegova

degenerirana varijanta, no koji nukleotidni slijed također sadrži jednu ili više mutacija koje kodiraju aminokiselinske supstitucije na jednom ili više aminokiselinskih ostataka, koji odgovara aminokiselinskom položaju 38, 48, 89, 99, 111, 136, 154, 179, 228, 238, 289, ili 298 u SEQ ID NO: 2, tako da stanice *S. avermitilis* soja ATCC 53692, u kojima je divlji tip *aveC* alela inaktiviran i koje ekspimiraju polinukleotidnu molekulu koja

2. Polinukleotidna molekula prema zahtjevu 1, **naznačena time** što avermektini klase 2:1 su cikloheksil-B2:cikloheksil-B1 avermektini.
3. Polinukleotidna molekula prema zahtjevu 2, **naznačena time** što različit odnos avermektina klase 2:1 je smanjen u usporedbi s odnosom klase 2:1, kakav daju stanice *S. avermitilis* soja ATCC 53692, koje ekspimiraju samo divlji tip *aveC* alela.
4. Polinukleotidna molekula prema zahtjevu 3, **naznačena time** što odnos avermektina klase 2:1 je oko 0,8:1 ili manji.
5. Polinukleotidna molekula prema zahtjevu 3, **naznačena time** što odnos avermektina klase 2:1 je oko 0,68:1 ili manji.
6. Polinukleotidna molekula prema zahtjevu 3, **naznačena time** što odnos avermektina klase 2:1 je oko 0,53:1 ili manji.
7. Polinukleotidna molekula prema zahtjevu 3, **naznačena time** što odnos avermektina klase 2:1 je oko 0,42:1 ili manji.
8. Polinukleotidna molekula prema zahtjevu 3, **naznačena time** što odnos avermektina klase 2:1 je oko 0,40:1 ili manji.
9. Polinukleotidna molekula prema zahtjevu 1, **naznačena time** što nukleotidni slijed također sadrži jednu ili više mutacija koje kodiraju aminokiselinsku supstituciju na jednom ili oba aminokiselinska ostatka, koji odgovaraju aminokiselinskim položajima 138 i 139 u SEQ ID NO: 2.
10. Polinukleotidna molekula prema zahtjevu 2, **naznačena time** što se aminokiselinske supstitucije bira između jedne ili više iz grupe koju čine:
 - (a) aminokiselinski ostatak Q na položaju 38, kojeg se zamjenjuje s P ili aminokiselinom koja je konzervativna supstitucija za P;
 - (b) aminokiselinski ostatak D na položaju 48, kojeg se zamjenjuje s E ili aminokiselinom koja je konzervativna supstitucija za E;
 - (c) aminokiselinski ostatak A na položaju 89, kojeg se zamjenjuje s T ili aminokiselinom koja je konzervativna supstitucija za T;
 - (d) aminokiselinski ostatak F na položaju 99, kojeg se zamjenjuje s S ili aminokiselinom koja je konzervativna supstitucija za S;
 - (e) aminokiselinski ostatak G na položaju 111, kojeg se zamjenjuje s V ili aminokiselinom koja je konzervativna supstitucija za V;
 - (f) aminokiselinski ostatak L na položaju 136, kojeg se zamjenjuje s P ili aminokiselinom koja je konzervativna supstitucija za P;
 - (g) aminokiselinski ostatak K na položaju 154, kojeg se zamjenjuje s E ili aminokiselinom koja je konzervativna supstitucija za E;
 - (h) aminokiselinski ostatak G na položaju 179, kojeg se zamjenjuje s S ili aminokiselinom koja je konzervativna supstitucija za S;
 - (i) aminokiselinski ostatak M na položaju 228, kojeg se zamjenjuje s T ili aminokiselinom koja je konzervativna supstitucija za T;
 - (j) aminokiselinski ostatak E na položaju 238, kojeg se zamjenjuje s D ili aminokiselinom koja je konzervativna supstitucija za D;
 - (k) aminokiselinski ostatak P na položaju 289, kojeg se zamjenjuje s L ili aminokiselinom koja je konzervativna supstitucija za L; i
 - (l) aminokiselinski ostatak Q na položaju 298, kojeg se zamjenjuje s H ili aminokiselinom koja je konzervativna supstitucija za H.
11. Polinukleotidna molekula prema zahtjevu 2, **naznačena time** što je tu mutirana kombinacija aminokiselinskih ostataka i što se kombinaciju bira između jedne ili više iz grupe koju čine:
 - (a) aminokiselinski ostaci D48 i A89;
 - (b) aminokiselinski ostaci S138, A139 i G179;
 - (c) aminokiselinski ostaci Q38, L136 i E238;
 - (d) aminokiselinski ostaci F99, S138, A139 i G179;
 - (e) aminokiselinski ostaci A139 i M228;
 - (f) aminokiselinski ostaci G111 i P289; i
 - (g) aminokiselinski ostaci A139, K154 i Q298.

12. Polinukleotidna molekula prema zahtjevu 11, **naznačena time** što se kombinaciju aminokiselinskih supstitucija bira između jedne ili više iz grupe koju čine:
 (a) D48E/A89T;
 (b) S138T/A139T/G179S;
 5 (c) Q38P/L136P/E238D;
 (d) F99S/S138T/A139T/G179S;
 (e) A139T/M228T;
 (f) G111V/P289L; i
 (g) A139/K154E/Q298H.
- 10 13. Polinukleotidna molekula prema zahtjevu 12, **naznačena time** što se mutacije u *aveC* slijedu, koje kodiraju D48E/A89T, sastoje u promjeni baze s T u A na nukleotidnom položaju koji odgovara nt 317 u SEQ ID NO: 1, te promjeni baze s G u A na nukleotidnom položaju koji odgovara nt 438 u SEQ ID NO: 1.
14. Polinukleotidna molekula prema zahtjevu 13, **naznačena time** što također sadrži promjenu baze s C u A na nukleotidnom položaju koji odgovara nt 353 u SEQ ID NO: 1, te promjenu baze s T u A na nukleotidnom položaju
 15 koji odgovara nt 1155 u SEQ ID NO: 1.
15. Polinukleotidna molekula prema zahtjevu 12, **naznačena time** što se mutacije u *aveC* slijedu, koje kodiraju S138T/A139T/G179S, sastoje u promjeni baze s T u A na nukleotidnom položaju koji odgovara nt 585 u SEQ ID NO: 1, promjeni baze s G u A na nukleotidnom položaju koji odgovara nt 588 od SEQ ID NO: 1, te promjeni baze s G u A na nukleotidnom položaju koji odgovara nt 708 u SEQ ID NO: 1.
- 20 16. Polinukleotidna molekula prema zahtjevu 15, **naznačena time** što također sadrži promjenu baze s G u A na nukleotidnom položaju koji odgovara nt 272 u SEQ ID NO: 1.
17. Polinukleotidna molekula prema zahtjevu 12, **naznačena time** što se mutacije u *aveC* slijedu, koje kodiraju Q38P/L136P/E238D, sastoje u promjeni baze s A u C na nukleotidnom položaju koji odgovara nt 286 u SEQ ID NO: 1, promjeni baze s T u C na nukleotidnom položaju koji odgovara nt 580 u SEQ ID NO: 1, te promjeni baze s
 25 A u T na nukleotidnom položaju koji odgovara nt 886 u SEQ ID NO: 1.
18. Polinukleotidna molekula prema zahtjevu 17, **naznačena time** što također sadrži promjenu baze s A u G na nukleotidnom položaju koji odgovara nt 24 u SEQ ID NO: 1, promjenu baze s T u C na nukleotidnom položaju koji odgovara nt 497 u SEQ ID NO: 1, te promjenu baze s C u T na nukleotidnom položaju koji odgovara nt 554 u SEQ ID NO: 1.
- 30 19. Polinukleotidna molekula prema zahtjevu 12, **naznačena time** što se mutacije u *aveC* slijedu, koje kodiraju F99S/S138T/A139T/G179S, sastoje u 3 bp deleciji na nukleotidnim položajima koji odgovaraju nt 173, 174 i 175 u SEQ ID NO: 1, promjeni baze s T u C na nukleotidnom položaju koji odgovara nt 469 u SEQ ID NO: 1, promjeni baze od T u A na nukleotidnom položaju koji odgovara nt 585 u SEQ ID NO: 1, promjeni baze s G u A na nukleotidnom položaju koji odgovara nt 588 u SEQ ID NO: 1, te promjeni baze s G u A na nukleotidnom položaju
 35 koji odgovara nt 708 u SEQ ID NO: 1.
20. Polinukleotidna molekula prema zahtjevu 19, **naznačena time** što također sadrži promjenu baze s C u T na nukleotidnom položaju koji odgovara nt 833 u SEQ ID NO: 1, te promjenu baze s G u A na nukleotidnom položaju koji odgovara nt 1184 u SEQ ID NO: 1.
21. Polinukleotidna molekula prema zahtjevu 12, **naznačena time** što se mutacije u *aveC* slijedu, koje kodiraju
 40 A139T/M228T, sastoje u promjeni baze s G u A na nukleotidnom položaju koji odgovara nt 588 u SEQ ID NO: 1, te promjeni baze s T u C na nukleotidnom položaju koji odgovara nt 856 u SEQ ID NO: 1.
22. Polinukleotidna molekula prema zahtjevu 12, **naznačena time** što se mutacije u *aveC* slijedu, koje kodiraju G111V/P289L, sastoje u promjeni baze s G u T na nukleotidnom položaju koji odgovara nt 505 u SEQ ID NO: 1, te promjeni baze s C u T na nukleotidnom položaju koji odgovara nt 1039 u SEQ ID NO: 1.
- 45 23. Polinukleotidna molekula prema zahtjevu 22, **naznačena time** što također sadrži promjenu baze s T u C na nukleotidnom položaju koji odgovara nt 155 u SEQ ID NO: 1, promjenu baze s C u T na nukleotidnom položaju koji odgovara nt 1202 u SEQ ID NO: 1, te promjenu baze s T u C na nukleotidnom položaju koji odgovara nt 1210 u SEQ ID NO: 1.
24. Polinukleotidna molekula prema zahtjevu 12, **naznačena time** što se mutacije u *aveC* slijedu, koje kodiraju
 50 A139T/K154E/Q298H, sastoje u promjeni baze s G u A na nukleotidnom položaju koji odgovara nt 588 u SEQ ID NO: 1, promjeni baze s A u G na nukleotidnom položaju koji odgovara nt 633 u SEQ ID NO: 1, te promjeni baze s A u T na nukleotidnom položaju koji odgovara nt 1067 u SEQ ID NO: 1.
25. Polinukleotidna molekula prema zahtjevu 24, **naznačena time** što također sadrži promjenu baze s G u T na nukleotidnom položaju koji odgovara nt 377 u SEQ ID NO: 1.
- 55 26. Rekombinantni vektor, **naznačen time** što sadrži polinukleotidnu molekulu prema zahtjevu 1.
27. Stanica domaćina, **naznačena time** što sadrži polinukleotidnu molekulu prema zahtjevu 1 ili rekombinantni vektor prema zahtjevu 26.
28. Stanica domaćina prema zahtjevu 27, **naznačena time** što je to *Streptomyces* stanica.
29. Postupak dobivanja novog soja bakterije *S. avermitilis*, **naznačen time** što se sastoji u mutiranju *aveC* alela u
 60 stanicama soja bakterije *S. avermitilis*, gdje ta mutacija rezultira supstitucijom u genskom produktu AveC različitog

aminokiselinskog ostatka na jednom od aminokiselinskih položaja koji odgovaraju aminokiselinskim ostacima 38, 48, 89, 99, 111, 136, 138, 139, 154, 179, 228, 238, 289 ili 298 u SEQ ID NO: 2, tako da stanice *S. avermitilis* soja u kojima je *aveC* alel tako mutiran daju odnos avermektina klasa 2:1 različit od odnosa kojeg daju stanice istog *S. avermitilis* soja, koje umjesto toga ekspimiraju samo divlji tip *aveC* alela.

30. Postupak prema zahtjevu 29, **naznačen time** što avermektini klasa 2:1 su cikloheksil-B2:cikloheksil-B1 avermektini.
31. Postupak prema zahtjevu 30, **naznačen time** što različit odnos avermektina klasa 2:1 je smanjen odnos.
32. Postupak prema zahtjevu 31, **naznačen time** što odnos avermektina klasa 2:1, kakav daju stanice *S. avermitilis* soja u kojima je *aveC* alel tako mutiran, je oko 0,8:1 ili manji.
33. Postupak prema zahtjevu 31, **naznačen time** što odnos avermektina klasa 2:1, kakav daju stanice *S. avermitilis* soja u kojima je *aveC* alel tako mutiran, je oko 0,68:1 ili manji.
34. Postupak prema zahtjevu 31, **naznačen time** što odnos avermektina klasa 2:1, kakav daju stanice *S. avermitilis* soja u kojima je *aveC* alel tako mutiran, je oko 0,53:1 ili manji.
35. Postupak prema zahtjevu 31, **naznačen time** što odnos avermektina klasa 2:1, kakav daju stanice *S. avermitilis* soja u kojima je *aveC* alel tako mutiran, je oko 0,42:1 ili manji.
36. Postupak prema zahtjevu 31, **naznačen time** što odnos avermektina klasa 2:1, kakav daju stanice *S. avermitilis* soja u kojima je *aveC* alel tako mutiran, je oko 0,40:1 ili manji.
37. Postupak prema zahtjevu 31, **naznačen time** što se također sastoji u uvođenju jedne ili više mutacija u *aveC* alel, koje kodiraju aminokiselinsku supstituciju na jednom ili oba aminokiselinska ostatka, koji odgovaraju aminokiselinskim položajima 138 i 139 od SEQ ID NO: 2.
38. Postupak prema zahtjevu 30, **naznačen time** što se supstitucije bira između jedne ili više iz grupe koju čine:
 - (a) aminokiselinski ostatak Q na položaju 38, kojeg se zamjenjuje s P ili aminokiselinom koja je konzervativna supstitucija za P;
 - (b) aminokiselinski ostatak D na položaju 48, kojeg se zamjenjuje s E ili aminokiselinom koja je konzervativna supstitucija za E;
 - (c) aminokiselinski ostatak A na položaju 89, kojeg se zamjenjuje s T ili aminokiselinom koja je konzervativna supstitucija za T;
 - (d) aminokiselinski ostatak F na položaju 99, kojeg se zamjenjuje s S ili aminokiselinom koja je konzervativna supstitucija za S;
 - (e) aminokiselinski ostatak G na položaju 111, kojeg se zamjenjuje s V ili aminokiselinom koja je konzervativna supstitucija za V;
 - (f) aminokiselinski ostatak L na položaju 136, kojeg se zamjenjuje s P ili aminokiselinom koja je konzervativna supstitucija za P;
 - (g) aminokiselinski ostatak K na položaju 154, kojeg se zamjenjuje s E ili aminokiselinom koja je konzervativna supstitucija za E;
 - (h) aminokiselinski ostatak G na položaju 179, kojeg se zamjenjuje s S ili aminokiselinom koja je konzervativna supstitucija za S;
 - (i) aminokiselinski ostatak M na položaju 228, kojeg se zamjenjuje s T ili aminokiselinom koja je konzervativna supstitucija za T;
 - (j) aminokiselinski ostatak E na položaju 238, kojeg se zamjenjuje s D ili aminokiselinom koja je konzervativna supstitucija za D;
 - (k) aminokiselinski ostatak P na položaju 289, kojeg se zamjenjuje s L ili aminokiselinom koja je konzervativna supstitucija za L; i
 - (l) aminokiselinski ostatak Q na položaju 298, kojeg se zamjenjuje s H ili aminokiselinom koja je konzervativna supstitucija za H.
39. Postupak prema zahtjevu 30, **naznačen time** što *aveC* alel se mutira, tako da kodira aminokiselinske supstitucije na kombinaciji aminokiselinskih položaja, te što se kombinaciju bira između jedne ili više iz grupe koju čine:
 - (a) aminokiselinski ostaci D48 i A89;
 - (b) aminokiselinski ostaci S138, A139 i G179;
 - (c) aminokiselinski ostaci Q38, L136 i E238;
 - (d) aminokiselinski ostaci F99, S138, A139 i G179;
 - (e) aminokiselinski ostaci A139 i M228;
 - (f) aminokiselinski ostaci G111 i P289; i
 - (g) aminokiselinski ostaci A139, K154 i Q298.
40. Postupak prema zahtjevu 39, **naznačen time** što se kombinaciju aminokiselinskih supstitucija bira između jedne ili više iz grupe koju čine:
 - (a) D48E/A89T;
 - (b) S138T/A139T/G179S;
 - (c) Q38P/L136P/E238D;
 - (d) F99S/S138T/A139T/G179S;

- (e) A139T/M228T;
- (f) G111V/P289L; i
- (g) A139/K154E/Q298H.

41. Postupak prema zahtjevu 40, **naznačen time** što se mutacije u *aveC* alelu, koje kodiraju D48E/A89T, sastoje u promjeni baze s T u A na nukleotidnom položaju u *aveC* alelu, koji odgovara nt 317 u SEQ ID NO: 1, te promjeni baze s G u A na nukleotidnom položaju u *aveC* alelu, koji odgovara nt 438 u SEQ ID NO: 1.
42. Postupak prema zahtjevu 41, **naznačen time** što se također sastoji u uvođenju bazne promjene s C u A na nukleotidnom položaju u *aveC* alelu, koji odgovara nt 353 u SEQ ID NO: 1, te bazne promjene s T u A na nukleotidnom položaju u *aveC* alelu, koji odgovara nt 1155 u SEQ ID NO: 1.
43. Postupak prema zahtjevu 40, **naznačen time** što se mutacije u *aveC* alelu, koje kodiraju S138T/A139T/G179S, sastoje u promjeni baze s T u A na nukleotidnom položaju u *aveC* alelu, koji odgovara nt 585 u SEQ ID NO: 1, promjeni baze s G u A na nukleotidnom položaju u *aveC* alelu, koji odgovara nt 588 u SEQ ID NO: 1, te promjeni baze s G u A na nukleotidnom položaju u *aveC* alelu, koji odgovara nt 708 u SEQ ID NO: 1.
44. Postupak prema zahtjevu 43, **naznačen time** što se također sastoji u promjeni baze s G u A na nukleotidnom položaju u *aveC* alelu, koji odgovara nt 272 u SEQ ID NO: 1.
45. Postupak prema zahtjevu 40, **naznačen time** što se mutacije u *aveC* alelu, koje kodiraju Q38P/L136P/E238D, sastoje u promjeni baze s A u C na nukleotidnom položaju u *aveC* alelu, koji odgovara nt 286 u SEQ ID NO: 1, promjeni baze s T u C na nukleotidnom položaju u *aveC* alelu, koji odgovara nt 580 u SEQ ID NO: 1, te promjeni baze s A u T na nukleotidnom položaju u *aveC* alelu, koji odgovara nt 886 u SEQ ID NO: 1.
46. Postupak prema zahtjevu 45, **naznačen time** što se također sastoji u uvođenju bazne promjene s A u G na nukleotidnom položaju u *aveC* alelu, koji odgovara nt 24 u SEQ ID NO: 1, bazne promjene s T u C na nukleotidnom položaju u *aveC* alelu, koji odgovara nt 497 u SEQ ID NO: 1, te bazne promjene s C u T na nukleotidnom položaju u *aveC* alelu, koji odgovara nt 554 u SEQ ID NO: 1.
47. Postupak prema zahtjevu 40, **naznačen time** što se mutacije u *aveC* alelu, koje kodiraju F99S/S138T/A139T/G179S, sastoje u 3 bp deleciji na nukleotidnim položajima u *aveC* alelu, koji odgovaraju nt 173, 174 i 175 u SEQ ID NO: 1, promjeni baze s T u C na nukleotidnom položaju u *aveC* alelu, koji odgovara nt 469 u SEQ ID NO: 1, promjeni baze s T u A na nukleotidnom položaju u *aveC* alelu, koji odgovara nt 585 u SEQ ID NO: 1, promjeni baze s G u A na nukleotidnom položaju u *aveC* alelu, koji odgovara nt 588 u SEQ ID NO: 1, te promjeni baze s G u A na nukleotidnom položaju u *aveC* alelu, koji odgovara nt 708 u SEQ ID NO: 1.
48. Postupak prema zahtjevu 47, **naznačen time** što se također sastoji u uvođenju bazne promjene s C u T na nukleotidnom položaju u *aveC* alelu, koji odgovara nt 833 u SEQ ID NO: 1, te bazne promjene s G u A na nukleotidnom položaju u *aveC* alelu, koji odgovara nt 1184 u SEQ ID NO: 1.
49. Postupak prema zahtjevu 40, **naznačen time** što se mutacije u *aveC* alelu, koje kodiraju A139T/M228T, sastoje u promjeni baze s G u A na nukleotidnom položaju u *aveC* alelu, koji odgovara nt 588 u SEQ ID NO: 1, te promjeni baze s T u C na nukleotidnom položaju u *aveC* alelu, koji odgovara nt 856 u SEQ ID NO: 1.
50. Postupak prema zahtjevu 40, **naznačen time** što se mutacije u *aveC* alelu koji kodira G111V/P289L sastoje u promjeni baze s G u T na nukleotidnom položaju u *aveC* alelu, koji odgovara nt 505 u SEQ ID NO: 1, te promjeni baze s C u T na nukleotidnom položaju u *aveC* alelu, koji odgovara nt 1039 u SEQ ID NO: 1.
51. Postupak prema zahtjevu 50, **naznačen time** što se također sastoji u uvođenju bazne promjene s T u C na nukleotidnom položaju u *aveC* alelu, koji odgovara nt 155 u SEQ ID NO: 1, bazne promjene s C u T na nukleotidnom položaju u *aveC* alelu, koji odgovara nt 1202 u SEQ ID NO: 1, te bazne promjene s T u C na nukleotidnom položaju u *aveC* alelu, koji odgovara nt 1210 u SEQ ID NO: 1.
52. Postupak prema zahtjevu 40, **naznačen time** što se mutacije u *aveC* alelu, koje kodiraju A139T/K154E/Q298H, sastoje u promjeni baze s G u A na nukleotidnom položaju u *aveC* alelu, koji odgovara nt 588 u SEQ ID NO: 1, promjeni baze s A u G na nukleotidnom položaju u *aveC* alelu, koji odgovara nt 633 u SEQ ID NO: 1, te promjeni baze s A u T na nukleotidnom položaju u *aveC* alelu, koji odgovara nt 1067 u SEQ ID NO: 1.
53. Postupak prema zahtjevu 40, **naznačen time** što se također sastoji u uvođenju bazne promjene s G u T na nukleotidnom položaju u *aveC* alelu, koji odgovara nt 377 u SEQ ID NO: 1.
54. *Streptomyces avermitilis* stanica, **naznačena time** što sadrži mutirani *aveC* alel, koji kodira genski produkt AveC koji sadrži supstituciju na jednom od aminokiselinskih položaja, koji odgovaraju aminokiselinskom ostatku 38, 48, 89, 99, 111, 136, 154, 179, 228, 238, 289, ili 298 u SEQ ID NO: 2, gdje ta stanica daje odnos avermektina klasa 2:1 različit od odnosa kakav daje stanica istog *S. avermitilis* soja, no koja umjesto toga eksprimira samo divlji tip *aveC* alela.
55. *S. avermitilis* stanica prema zahtjevu 54, **naznačena time** što avermektini klasa 2:1 su cikloheksil-B2:cikloheksil-B1-avermektini.
56. *S. avermitilis* stanica prema zahtjevu 55, **naznačena time** što različit odnos avermektina klasa 2:1 je smanjen odnos.
57. *S. avermitilis* stanica prema zahtjevu 56, **naznačena time** što daje odnos avermektina klasa 2:1 od oko 0,8:1 ili manji.

58. *S. avermitilis* stanica prema zahtjevu 56, **naznačena time** što daje odnos avermektina klasa 2:1 od oko 0,68:1 ili manji.
59. *S. avermitilis* stanica prema zahtjevu 56, **naznačena time** što daje odnos avermektina klasa 2:1 od oko 0,53:1 ili manji.
- 5 60. *S. avermitilis* stanica prema zahtjevu 56, **naznačena time** što daje odnos avermektina klasa 2:1 od oko 0,42:1 ili manji.
61. *S. avermitilis* stanica prema zahtjevu 56, **naznačena time** što daje odnos avermektina klasa 2:1 od oko 0,40:1 ili manji.
- 10 62. *S. avermitilis* stanica prema zahtjevu 55, **naznačena time** što *aveC* alel također kodira aminokiselinsku supstituciju na jednom ili oba aminokiselinska ostatka, koji odgovaraju aminokiselinskim položajima 138 i 139 u SEQ ID NO: 2.
63. *S. avermitilis* stanica prema zahtjevu 55, **naznačena time** što se supstitucije bira između jedne ili više iz grupe koju čine:
- 15 (a) aminokiselinski ostatak Q na položaju 38, kojeg se zamjenjuje s P ili aminokiselinom koja je konzervativna supstitucija za P;
- (b) aminokiselinski ostatak D na položaju 48, kojeg se zamjenjuje s E ili aminokiselinom koja je konzervativna supstitucija za E;
- (c) aminokiselinski ostatak A na položaju 89, kojeg se zamjenjuje s T ili aminokiselinom koja je konzervativna supstitucija za T;
- 20 (d) aminokiselinski ostatak F na položaju 99, kojeg se zamjenjuje s S ili aminokiselinom koja je konzervativna supstitucija za S;
- (e) aminokiselinski ostatak G na položaju 111, kojeg se zamjenjuje s V ili aminokiselinom koja je konzervativna supstitucija za V;
- 25 (f) aminokiselinski ostatak L na položaju 136, kojeg se zamjenjuje s P ili aminokiselinom koja je konzervativna supstitucija za P;
- (g) aminokiselinski ostatak K na položaju 154, kojeg se zamjenjuje s E ili aminokiselinom koja je konzervativna supstitucija za E;
- (h) aminokiselinski ostatak G na položaju 179, kojeg se zamjenjuje s S ili aminokiselinom koja je konzervativna supstitucija za S;
- 30 (i) aminokiselinski ostatak M na položaju 228, kojeg se zamjenjuje s T ili aminokiselinom koja je konzervativna supstitucija za T;
- (j) aminokiselinski ostatak E na položaju 238, kojeg se zamjenjuje s D ili aminokiselinom koja je konzervativna supstitucija za D;
- 35 (k) aminokiselinski ostatak P na položaju 289, kojeg se zamjenjuje s L ili aminokiselinom koja je konzervativna supstitucija za L; i
- (l) aminokiselinski ostatak Q na položaju 298, kojeg se zamjenjuje s H ili aminokiselinom koja je konzervativna supstitucija za H;
- 40 64. *S. avermitilis* stanica prema zahtjevu 55, **naznačena time** što *aveC* alel se mutira, tako da kodira aminokiselinske supstitucije u kombinaciji aminokiselinskih položaja, te gdje se kombinaciju bira između jedne ili više iz grupe koju čine:
- (a) aminokiselinski ostaci D48 i A89;
- (b) aminokiselinski ostaci S138, A139 i G179;
- (c) aminokiselinski ostaci Q38, L136 i E238;
- (d) aminokiselinski ostaci F99, S138, A139 i G179;
- 45 (e) aminokiselinski ostaci A139 i M228;
- (f) aminokiselinski ostaci G111 i P289; i
- (g) aminokiselinski ostaci A139, K154 i Q298.
- 50 65. *S. avermitilis* stanica prema zahtjevu 64, **naznačena time** što se kombinaciju aminokiselinskih supstitucija bira između jedne ili više iz grupe koju čine:
- (a) D48E/A89T;
- (b) S138T/A139T/G179S;
- (c) Q38P/L136P/E238D;
- (d) F99S/S138T/A139T/G179S;
- (e) A139T/M228T;
- 55 (f) G111V/P289L; i
- (g) A139T/K154E/Q298H.
66. *S. avermitilis* stanica prema zahtjevu 65, **naznačena time** što se mutacije u *aveC* alelu, koje kodiraju D48E/A89T, sastoje u promjeni baze s T u A na nukleotidnom položaju u *aveC* alelu, koji odgovara nt 317 u SEQ ID NO: 1, te promjeni baze s G u A na nukleotidnom položaju u *aveC* alelu, koji odgovara nt 438 u SEQ ID NO: 1.

67. *S. avermitilis* stanica prema zahtjevu 66, **naznačena time** što se mutacije u *aveC* alelu, koje kodiraju D48E/A89T, također sastoje u promjeni baze s C u A na nukleotidnom položaju u *aveC* alelu, koji odgovara nt 353 u SEQ ID NO: 1, te promjeni baze s T u A na nukleotidnom položaju u *aveC* alelu, koji odgovara nt 1155 u SEQ ID NO: 1.
- 5 68. *S. avermitilis* stanica prema zahtjevu 65, **naznačena time** što se mutacije u *aveC* alelu, koje kodiraju S138T/A139T/G179S, sastoje u promjeni baze s T u A na nukleotidnom položaju u *aveC* alelu, koji odgovara nt 585 u SEQ ID NO: 1, promjeni baze s G u A na nukleotidnom položaju u *aveC* alelu, koji odgovara nt 588 u SEQ ID NO: 1, te promjeni baze s G u A na nukleotidnom položaju u *aveC* alelu, koji odgovara nt 708 u SEQ ID NO: 1.
- 10 69. *S. avermitilis* stanica prema zahtjevu 68, **naznačena time** što se mutacije u *aveC* alelu, koji kodira S138T/A139T/G179S, također sastoje u promjeni baze s G u A na nukleotidnom položaju u *aveC* alelu, koji odgovara nt 272 u SEQ ID NO: 1.
70. *S. avermitilis* stanica prema zahtjevu 65, **naznačena time** što se mutacije u *aveC* alelu, koje kodiraju Q38P/L136P/E238D, sastoje u promjeni baze s A u C na nukleotidnom položaju u *aveC* alelu, koji odgovara nt 286 u SEQ ID NO: 1, promjeni baze s T u C na nukleotidnom položaju u *aveC* alelu, koji odgovara nt 580 u SEQ ID NO: 1, te promjeni baze s A u T na nukleotidnom položaju u *aveC* alelu, koji odgovara nt 886 u SEQ ID NO: 1.
- 15 71. *S. avermitilis* stanica prema zahtjevu 70, **naznačena time** što se mutacije u *aveC* alelu, koje kodiraju Q38P/L136P/E238D, također sastoje u promjeni baze s A u G na nukleotidnom položaju u *aveC* alelu koji odgovara nt 24 u SEQ ID NO: 1, promjeni baze s T u C na nukleotidnom položaju u *aveC* alelu koji odgovara nt 497 u SEQ ID NO: 1, te promjeni baze s C u T na nukleotidnom položaju u *aveC* alelu koji odgovara nt 554 u SEQ ID NO: 1.
- 20 72. *S. avermitilis* stanica prema zahtjevu 65, **naznačena time** što se mutacije u *aveC* alelu, koje kodiraju F99S/S138T/A139T/G179S, sastoje u 3 bp deleciji na nukleotidnim položajima u *aveC* alelu, koji odgovaraju nt 173, 174 i 175 u SEQ ID NO: 1, promjeni baze s T u C na nukleotidnom položaju u *aveC* alelu, koji odgovara nt 469 u SEQ ID NO: 1, promjeni baze s T u A na nukleotidnom položaju u *aveC* alelu, koji odgovara nt 585 u SEQ ID NO: 1, promjeni baze s G u A na nukleotidnom položaju u *aveC* alelu, koji odgovara nt 588 u SEQ ID NO: 1, te promjeni baze s G u A na nukleotidnom položaju u *aveC* alelu, koji odgovara nt 708 u SEQ ID NO: 1.
- 25 73. *S. avermitilis* stanica prema zahtjevu 72, **naznačena time** što se mutacije u *aveC* alelu, koje kodiraju F99S/S138T/A139T/G179S, također sastoje u promjeni baze s C u T na nukleotidnom položaju u *aveC* alelu, koji odgovara nt 833 u SEQ ID NO: 1, te promjeni baze s G u A na nukleotidnom položaju u *aveC* alelu, koji odgovara nt 1184 u SEQ ID NO: 1.
- 30 74. *S. avermitilis* stanica prema zahtjevu 65, **naznačena time** što se mutacije u *aveC* alelu, koje kodiraju A139T/M228T, sastoje u promjeni baze s G u A na nukleotidnom položaju u *aveC* alelu, koji odgovara nt 588 u SEQ ID NO: 1, te promjeni baze s T u C na nukleotidnom položaju u *aveC* alelu, koji odgovara nt 856 u SEQ ID NO: 1.
- 35 75. *S. avermitilis* stanica prema zahtjevu 65, **naznačena time** što se mutacije u *aveC* alelu, koje kodiraju G111V/P289L, sastoje u promjeni baze s G u T na nukleotidnom položaju u *aveC* alelu, koji odgovara nt 505 u SEQ ID NO: 1, te promjeni baze s C u T na nukleotidnom položaju u *aveC* alelu, koji odgovara nt 1039 od SEQ ID NO: 1.
- 40 76. *S. avermitilis* stanica prema zahtjevu 75, **naznačena time** što se mutacije u *aveC* alelu, koje kodiraju G111V/P289L, također sastoje u promjeni baze s T u C na nukleotidnom položaju u *aveC* alelu, koji odgovara nt 155 u SEQ ID NO: 1, promjeni baze s C u T na nukleotidnom položaju u *aveC* alelu, koji odgovara nt 1202 u SEQ ID NO: 1, te promjenu baze od T u C na nukleotidnom položaju u *aveC* alelu, koji odgovara nt 1210 u SEQ ID NO: 1.
- 45 77. *S. avermitilis* stanica prema zahtjevu 65, **naznačena time** što se mutacije u *aveC* alelu, koje kodiraju A139T/K154E/Q298H, sastoje u promjeni baze s G u A na nukleotidnom položaju u *aveC* alelu, koji odgovara nt 588 u SEQ ID NO: 1, promjeni baze s A u G na nukleotidnom položaju u *aveC* alelu, koji odgovara nt 633 u SEQ ID NO: 1, te promjeni baze s A u T na nukleotidnom položaju u *aveC* alelu, koji odgovara nt 1067 u SEQ ID NO: 1.
- 50 78. *S. avermitilis* stanica prema zahtjevu 77, **naznačena time** što se mutacije u *aveC* alelu, koje kodiraju A139T/K154E/Q298H, također sastoje u promjeni baze s G u T na nukleotidnom položaju u *aveC* alelu, koji odgovara nt 377 u SEQ ID NO: 1.
- 55 79. Postupak dobivanja avermektina, **naznačen time** što se sastoji u uzgoju stanica prema zahtjevu 55 u mediju za kulturu, pod uvjetima koji tu omogućuju ili induciraju dobivanje avermektina, te prikupljanju navedenih avermektina iz kulture.
80. Pripravak cikloheksil-B2:cikloheksil-B1 avermektina, koje proizvode stanice bakterije *Streptomyces avermitilis*, **naznačen time** što sadrži cikloheksil-B2:cikloheksil-B1 avermektin u odnosu od oko 0,68:1 ili manjem, u mediju za kulturu u kojem se uzgaja stanice.
81. Pripravak cikloheksil-B2:cikloheksil-B1 avermektina, koje daju stanice soja bakterije *Streptomyces avermitilis*, koje eksprimiraju mutirani *aveC* alel, koji kodira genski produkt, koji dovodi do smanjenja odnosa klasa 2:1 cikloheksil-B2:cikloheksil-B1 avermektina, koje daju te stanice, u usporedbi sa stanicama istog soja bakterije *S. avermitilis*, koje ne eksprimiraju mutirani *aveC* alel, već umjesto toga eksprimiraju samo divlji tip *aveC* alela,

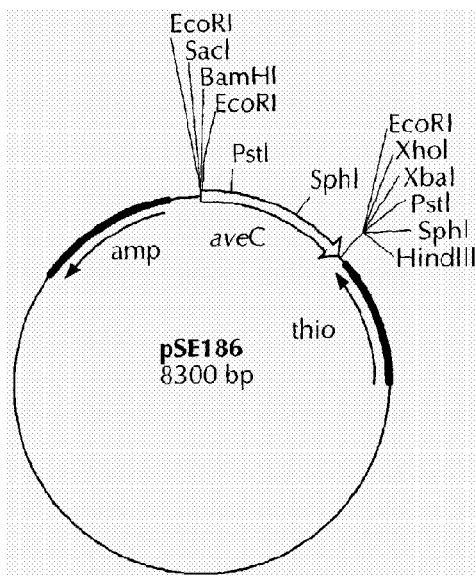
naznačen time što taj pripravak sadrži cikloheksil-B2:cikloheksil-B1 avermektine u odnosu od oko 0,68:1 ili manjem, u mediju za kulturu u kojem se uzgaja stanice.

5

SAŽETAK

- 10 Ovaj izum odnosi se na polinukleotidne molekule, koje sadrže nukleotidne sljedove koji kodiraju genski produkt *aveC*, koje polinukleotidne molekule se može upotrijebiti za promjenu odnosa ili količina avermektina klasa 2:1, dobivenih u fermentacijskim kulturama bakterije *S. avermitilis*. Ovaj izum također se odnosi na vektore, stanice domaćina, te mutantne sojeve bakterije *S. avermitilis* u kojima je *aveC* gen inaktiviran ili mutiran, kako bi se promijenilo odnos ili količinu dobivenih avermektina klasa 2:1.

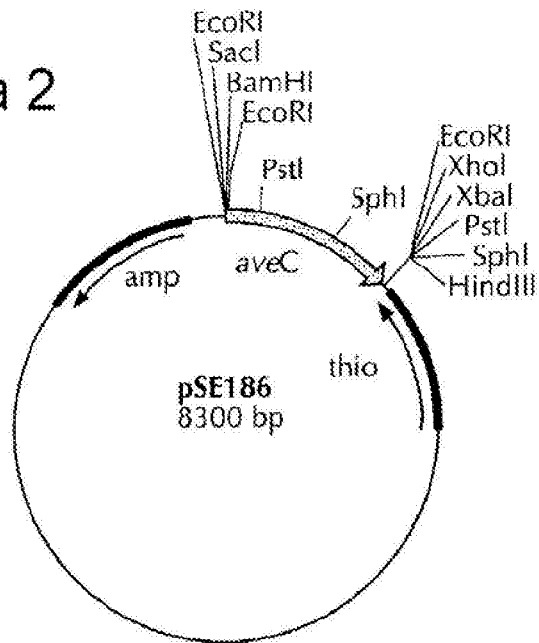
15



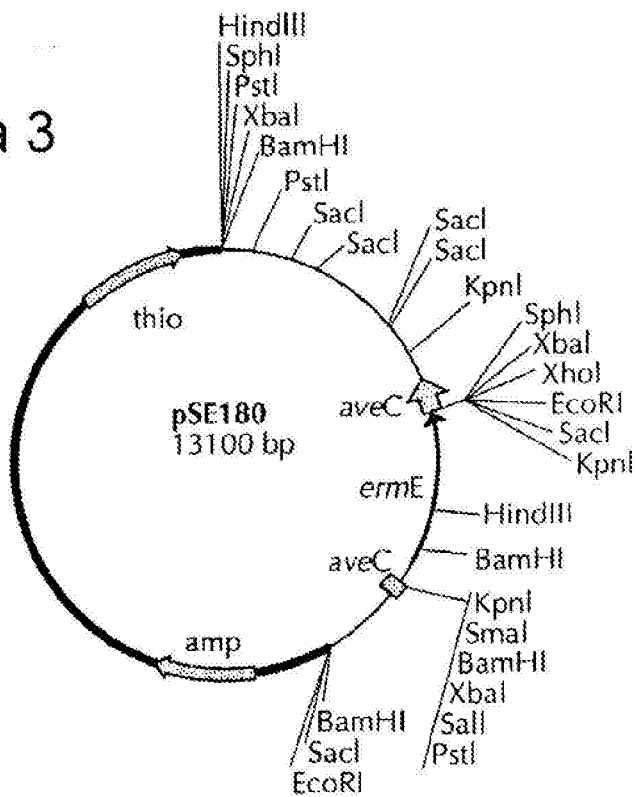
[illegible]

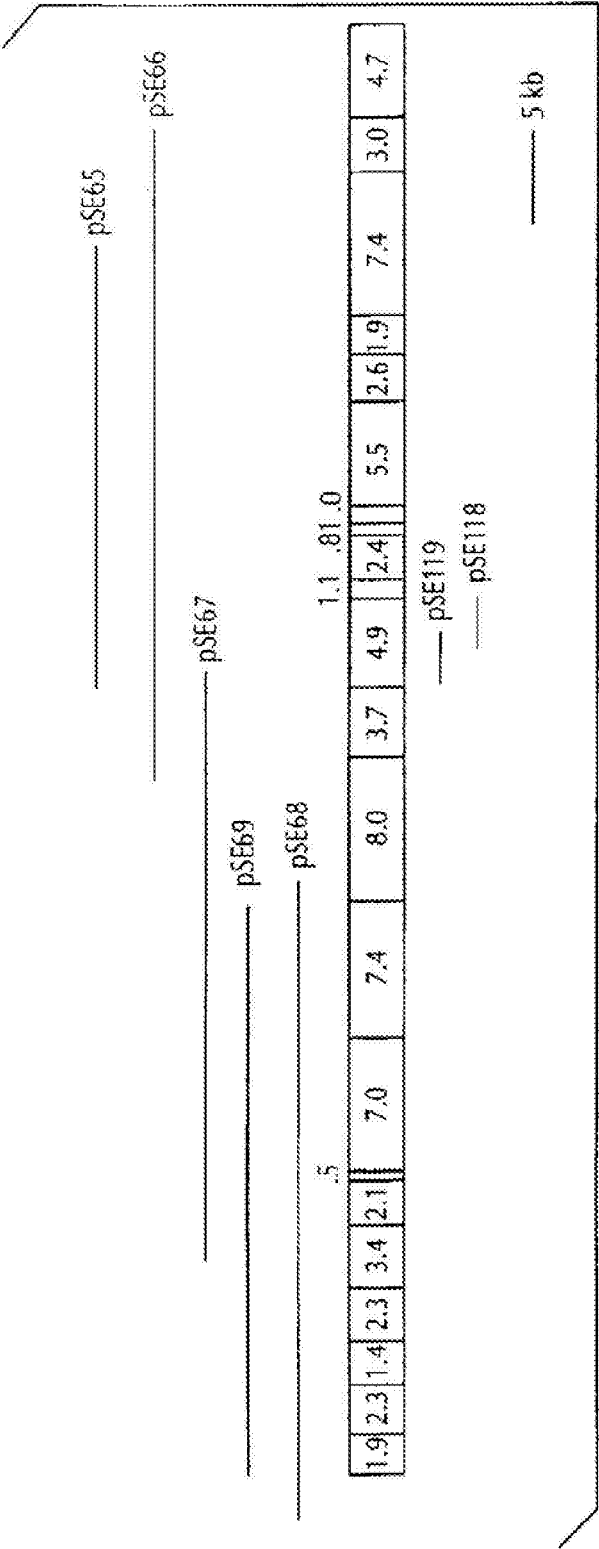
Slits 1

Slika 2

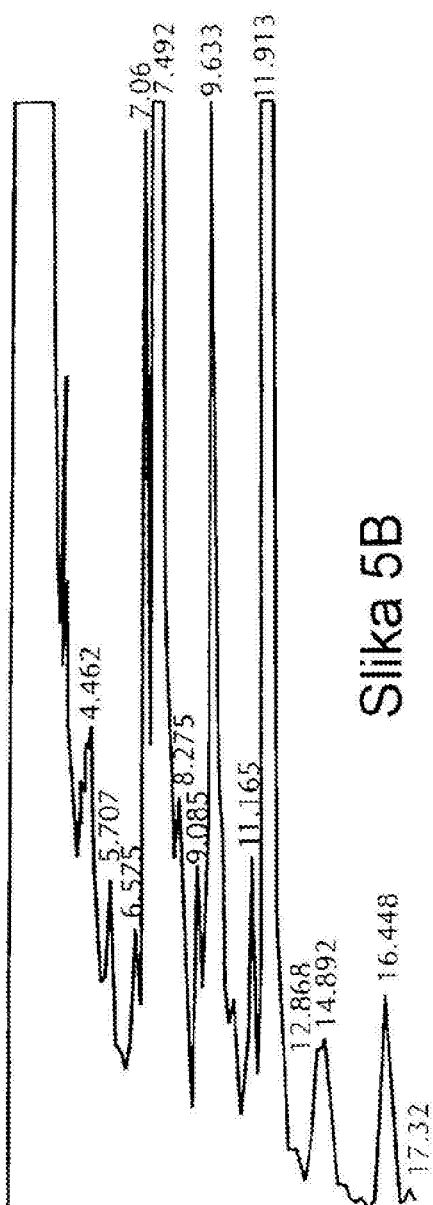
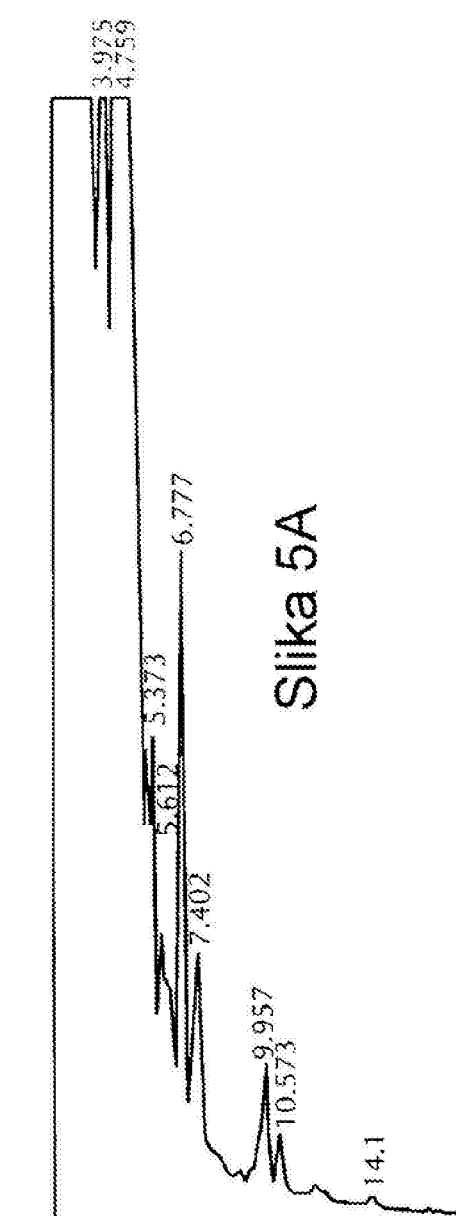


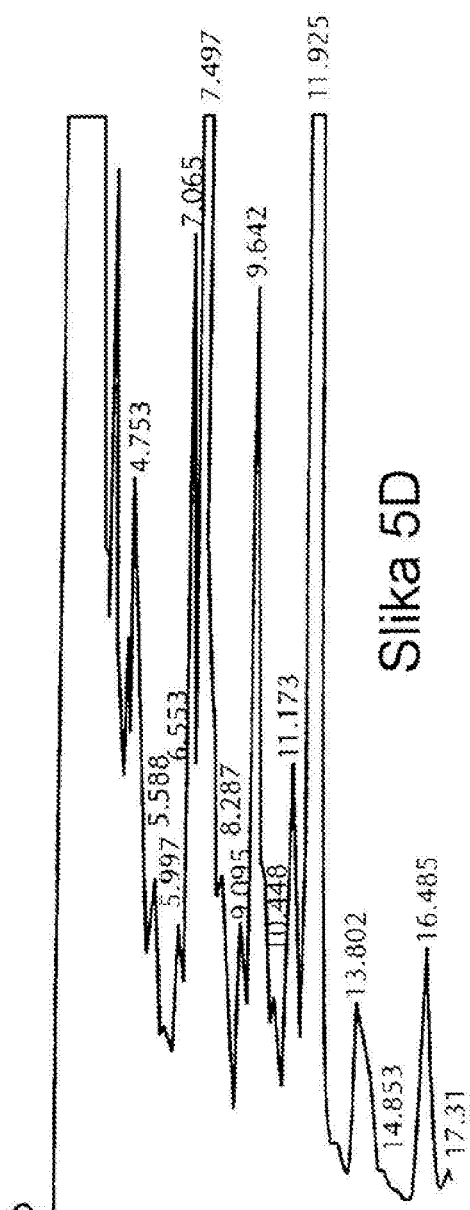
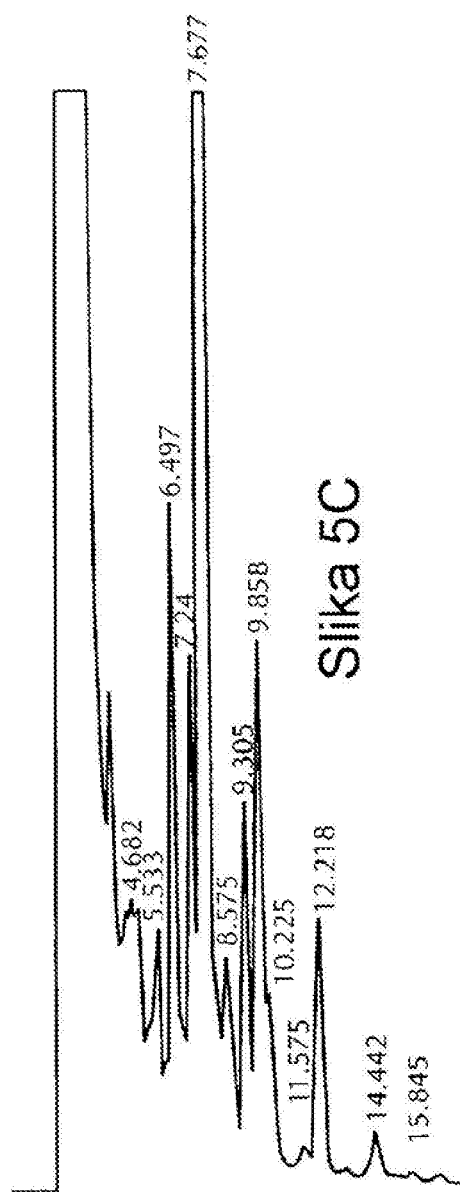
Slika 3





Slika 4





Slika 6

```

S. ave
S. gri
S. hyg
Cons

```

.....
.....
VFTLP

1 50

```

S. ave VVVWAGVGLL FLALQAYVFS RWAADGGYRL IETAGQGQGG SKDTGTDTV
S. gri VIGWAALGAV FLVLQVYVFA RWTADGGYHL ADVSGPDGRE PGHRRIIDVL
S. hyg VTLWACVGAL VLGLQVYVFA AWLADSGYR IEKASPARGG GDSERIADVL
Cons V--WA-vGal fL-LQVYVFa rW-ADgGYrl ie-agp--gg ---r--DVI

```

51 100

```

S. ave YPVISVVCIT AAAAWLFRRR RVERRLLFDA LLFLGLLFAS WQSPLMNNWFH
S. gri LPALSMAGVV GLAPWLVRWW RAERRLSFDA LLFTGVLFAG WLSPLMNNWFH
S. hyg IPLLSVVGAV VLAVCLYRRC RARRRLTFDA SLFIGLLSAS WQSPLMNNWIN
Cons -P-lSvvg-v -lA-wL-RRc RaeRRL-FDA lLF-GlLfAs WqSPLMNNwfH

```

101 150

```

S. ave SVLVSNASVW GAVGSWGPYV PGWQGAGPGA EAEMPLASAS VCMSALIVTV
S. gri PVLMANHVVW GAVGSWGPYV PGWRGLPPGK EAELPLVTFE LGSTVLLGLV
S. hyg PVLASNVNVF GAVASWGPYV PGWQGAGAHQ EAELPLATLS ICMTAMMAAV
Cons pVL-sN--Vw GAVgSWGPYV PGWqGagpg- EAELPlat-S -cmtal---v

```

151 200

```

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

```

201 250

```

S. ave LPEVTLWSGE WYQFPVYQAV GSGLVCCMLG SLRFFRDERD ESWVERGAWR
S. gri LPTVTLWRGA WYRAR-----
S. hyg VPELTIWSGH WYQFPYQMV ASALFGASLG AARHFRNRRG ETCLESQAAL
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

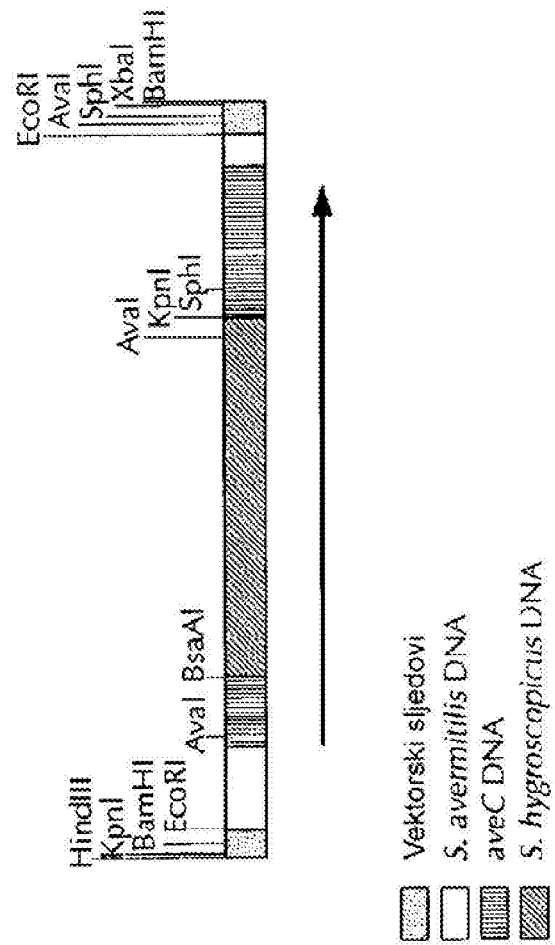
```

301

```

S. ave QAPAAY*
S. gri -----
S. hyg RPAAGY*
Cons ---a-y

```



Slika 7